

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR LES FACTEURS DU DÉVELOPPEMENT VIRAL ET LEUR RÔLE DANS L'ÉVOLUTION DE L'INFECTION

par André LWOFF et Marguerite LWOFF (*) (**)

(avec la collaboration technique d'Evelyne RITZ
et Marie-Claire MAIGNÉ).

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne)

INTRODUCTION.

Pour qu'un virus exerce une action pathogène dans un organisme, il faut que la particule infectieuse soit capable de s'y multiplier. Elle doit pour cela être adsorbée sur certaines cellules et y pénétrer. Adsorption et pénétration sont ce que l'on pourrait appeler les facteurs primaires de la virulence. Ce sont des facteurs nécessaires mais non suffisants car le développement d'un virus dans une cellule ne suit pas fatalement sa pénétration.

Lorsqu'un virus est injecté à un animal sensible, il s'y reproduit et des cellules sont tuées. Tout d'abord, le nombre des particules infectieuses augmente rapidement. Puis la vitesse de reproduction virale décroît, et enfin la multiplication du virus s'arrête. Selon la nature et le nombre des cellules détruites, l'animal ou bien mourra ou bien survivra, avec ou sans séquelles. Le sort de l'animal infecté dépend, cela est hors de doute, de l'intensité de la

(*) Ces recherches ont bénéficié d'une subvention de la « National Foundation » des Etats-Unis d'Amérique.

(**) Manuscrit reçu le 28 septembre 1959.

multiplication virale et de la nature des espèces cellulaires atteintes. Le problème de l'infection ainsi posé paraît simple. Cependant un organisme n'est pas, comme une culture *in vitro*, constitué par une population homogène de cellules vivant dans un milieu défini et constant. Cette remarque s'applique particulièrement à un organisme atteint d'une maladie virale. Le virus modifie la cellule qu'il parasite, les produits de la cellule infectée influent sur l'organisme, et les réactions de l'organisme perturbé modifient à leur tour le système cellule-virus. De multiples facteurs sont certainement capables d'exercer leur action sur le système cellule-virus et par là de jouer un rôle déterminant dans l'évolution de l'infection virale. Le sort d'un animal infecté dépendra en dernière analyse de la nature et de l'intensité des réactions de l'organisme ainsi que de la sensibilité de la souche virale considérée aux conditions nouvelles créées par les réactions. Celles-ci peuvent être soit des réactions spécifiques, soit des réactions non spécifiques.

Les réactions spécifiques, la formation d'anticorps, interviennent relativement tard au cours de l'infection. Bien souvent, semble-t-il, le sort de l'animal infecté est décidé au moment où les anticorps ont atteint une concentration suffisante pour modifier de façon notable la multiplication virale. De plus, ce sont surtout les infections du système nerveux qui nous intéressent ici. Or, précisément dans le cas du virus de la poliomyélite qui fait l'objet de notre étude, on sait que les anticorps spécifiques ne peuvent empêcher la propagation de cellule à cellule du virus qui a pénétré ou que l'on a introduit dans le système nerveux (Bodian [4]). Certes, les anticorps antiviraux jouent dans la protection de l'organisme un rôle que l'on ne saurait leur dénier. Cependant nous examinerons exclusivement ici l'intervention des facteurs non spécifiques, en fait de deux d'entre eux, la réaction du milieu et la température. Nous nous proposons de montrer qu'une faible baisse du pH et une légère augmentation de température peuvent affecter la multiplication virale de manière appréciable, et qu'il existe une corrélation entre la virulence des diverses souches du virus de la poliomyélite et la résistance de leur développement aux températures élevées.

Notre hypothèse de départ était très simple. La fièvre, réaction quasi générale ou en tout cas fréquente de l'organisme aux infections virales, pourrait jouer un rôle favorable dans l'évolution de l'infection. Ainsi qu'on le verra, cette hypothèse n'était pas nouvelle. Nous l'avons cependant exploitée et présentons aujourd'hui un ensemble d'observations et d'expériences, ainsi qu'un corps de doctrine cohérent relatif au rôle des agents non spécifiques dans l'évolution des infections virales, avec des considérations sur les facteurs qui gouvernent la neurovirulence et, d'une façon plus générale, la virulence. Les idées et les expériences qui ont présidé

à ce travail ou qui en ont été l'aboutissement ont été décrites brièvement dans quelques notes préliminaires [30, 31, 32], et discutées dans une conférence donnée aux Etats-Unis qui a été déjà publiée [29]. Nous apportons aujourd'hui un exposé plus complet des données expérimentales et une discussion de quelques points jugés particulièrement importants.

Dans la partie théorique qui est l'élément essentiel de ce mémoire interviendront des données relatives : 1° aux divers facteurs du milieu qui modifient le développement viral ; 2° aux caractères génétiques qui gouvernent la sensibilité du virus à ces facteurs ; 3° aux relations entre ces caractères génétiques viraux et la virulence ; 4° aux réactions de l'organisme à l'égard de la cellule infectée en tant qu'elles influencent le développement viral ; 5° au rôle de ces réactions non spécifiques dans l'évolution de l'infection virale ; 6° à l'application de ces données à la thérapeutique.

L'histoire du problème qui nous préoccupe est complexe, nécessairement. Elle est d'autant plus difficile à présenter que la progression de nos connaissances n'a pas suivi un ordre logique. En effet, comme il arrive souvent, tout a commencé par les applications pratiques. Le développement des concepts n'a pas suivi le rythme des découvertes expérimentales et la naissance de la synthèse doctrinale unifiaante a été particulièrement tardive. Nous avons finalement décidé de rappeler simplement, au début de chaque paragraphe, l'essentiel des résultats de nos prédécesseurs et de reprendre, dans la discussion générale, l'ensemble du déroulement historique des idées.

TECHNIQUES.

Nous avons appliqué les méthodes classiques de culture des cellules et de titrage des particules infectieuses. Nous ne nous étendrons donc pas sur les techniques sauf pour quelques points qui méritent d'être précisés.

1° Cellules.

Nous avons utilisé, aussi bien pour les expériences que pour les titrages, la cellule KB, cellule épithéliale maligne d'origine humaine, isolée en 1955 par Harry Eagle [45]. Toutes les expériences, sauf mention spéciale, ont été faites avec un clone KB21 qui a été obtenu en ensemencant, dans un tube renfermant 1 ml de milieu liquide (milieu d'entretien, voir ci-dessous), une cellule unique prélevée à la pipette parmi une population de cellules isolées en suspension. Les titrages, en revanche, ont été pratiqués avec la souche originelle conservée par passages successifs depuis octobre 1955. Dans certains cas, nous avons eu recours aux cellules épithéliales de rein de singe (macaques ou cynocéphales). On reviendra plus loin sur certains détails techniques concernant les titrages.

2° Milieux.

a) MILIEU D'ENTRETIEN. — Les cellules KB (souche sauvage et clone KB21) sont entretenues dans un milieu à la lactalbumine hydrolysée et à l'extrait de levure additionné de sérum de cheval selon une formule de Dulbecco et Vogt. Nous le désignons sous l'appellation LaYe (pour *Lactalbumine-Yeast*). Sa composition est la suivante : ClNa, 7,17 g; ClK, 0,4 g; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$, 0,125 g; Cl_2Ca , 0,2 g; bicarbonate de sodium, 2,2 g; glucose, 4,5 g; hydrolysate de lactalbumine, 5 g; extrait de levure, 1 g; rouge de phénol à 10 p. 1 000, 1,5 ml.

La phase gazeuse est constituée par un mélange d'air et de gaz carbonique à 4 p. 100. Ce milieu est stérilisé par filtration sur filtre Seitz.

Du sérum de cheval (5 p. 100) est ajouté à ce milieu. Le sérum de veau convient tout aussi bien.

b) MILIEU D'EXPÉRIENCE. — Pour les expériences, on utilise le même milieu soit tel quel, soit en faisant varier, selon les besoins, la concentration en bicarbonate et la proportion de CO_2 .

A certaines phases des expériences, on se sert aussi d'un milieu à la lactalbumine non tamponné par le bicarbonate de sodium (formule de Melnick légèrement modifiée); il est désigné sous le nom de LaMel (pour *Lactalbumine de Melnick*). Sa formule est : solution saline de Hanks, 880 ml; solution de lactalbumine à 5 p. 100 dans le milieu de Hanks, 100 ml; CO_3Na_2 à 1,4 p. 100, 20 ml. Ce milieu est stérilisé par filtration.

c) SOLUTIONS SALINES. — Solution tamponnée de Dulbecco (PBS) : 1° ClNa 8 g, ClK 0,2 g, PO_4HNa_2 1,15 g, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,2 g, eau distillée 800 ml; 2° Cl_2Ca 0,1 g, eau distillée 100 ml; 3° $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, eau distillée 100 ml. Autoclaver séparément 1, 2 et 3. Mélanger après refroidissement.

Solution tampon destinée au lavage des cellules avant leur décollement et séparation par le versénate : formule du PBS à l'exclusion des sels de calcium et de magnésium.

Solution de versénate de sodium servant à préparer les suspensions cellulaires : 0,2 g pour 1 litre de la solution tampon ci-dessus. Stérilisation à 115°.

d) MILIEUX POUR LE TITRAGE DES PARTICULES INFECTIEUSES. — Milieu gélosé au rouge neutre : gélose Difco, 1,8 g; rouge neutre, 0,005 g; eau distillée, 100 ml. Stérilisation à 115°. Pour le titrage, utiliser parties égales de gélose et milieu LaYe formule double.

Milieu gélosé dépourvu de colorant pour la cellule KB : gélose Difco, 2 g; eau distillée, 100 ml. Sous-couche = parties égales de gélose et de milieu LaYe formule double. Couche supérieure : gélose, 2 g; gélatine, 5,5 g; rouge de phénol à 10 p. 100, 0,1 ml; eau distillée, 100 ml; OHNa N/1, environ 1,6 ml. Parties égales de cette gélose-gélatine et de milieu LaYe double.

3° Titrage des particules infectieuses.

Les titrages des particules infectieuses sont effectués sur cellules KB ou sur cellules épithéliales de rein de singe selon la méthode de Dulbecco (technique de Cooper [9]). Nous opérons dans des boîtes de Petri de 6 mm de diamètre. La sous-couche est constituée par 4 ml de milieu nutritif gélosé ; la couche supérieure, par 1,2 ml de milieu gélosé auquel est ajouté 0,3 ml du mélange cellules-virus, soit 0,1 ml de la suspension de particules virales à titrer et 0,2 ml de cellules (4 millions environ dans le cas de la cellule KB, 12 à 15 millions dans le cas de la cellule rénale de singe ; ce nombre peut varier dans de larges proportions sans inconvénient).

Dans le cas des cellules rénales de singe, la coloration vitale des cellules ayant échappé à la dégénérescence virale est obtenue par le rouge neutre préalablement incorporé au milieu. Les plages apparaissent en blanc sur fond rouge. Dans le cas des cellules KB, bien que les plages soient visibles sans coloration aucune, il est néanmoins préférable de les colorer pour la commodité de leur dénombrement. Nous utilisons le bleu trypan qui teint les cellules mortes, tuées par le virus : les plages apparaissent en bleu foncé sur fond clair et sont ainsi très faciles à compter sous un éclairage favorable.

La coloration est faite au moment de la lecture des plages, c'est-à-dire, dans le cas le plus courant, après soixante-douze heures environ. On dispose d'une solution-mère de bleu trypan à 1 p. 100 dans l'eau distillée. Au moment de l'emploi, cette solution est diluée au dixième dans un milieu à la lactalbumine (LaMel, v. p. 176) ou dans une solution saline tamponnée. De cette solution, 2 ml sont pipetés avec précaution dans chaque boîte de Petri et laissés en place pendant vingt à trente minutes, soit à 36°, soit à la température du laboratoire. Le liquide est ensuite soutiré. Les plages peuvent être comptées immédiatement ou après quelques heures, ou même le lendemain si l'on a soin de replacer les boîtes de Petri à l'étuve à 36°, en atmosphère air/CO₂ à 4 p. 100.

Le seul point délicat de cette coloration tient à l'origine du bleu trypan. Pour chaque échantillon de bleu, il est bon de procéder à des essais préalables qui permettent de fixer très exactement les concentrations, temps d'action, et réaction du milieu les plus favorables. C'est ainsi que certains échantillons de bleu trypan ne donnent une parfaite coloration qu'en milieu acide, pH 6,5 environ, alors que d'autres donnent de bons résultats à pH 7,2. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec du trypan bleu de marque Gröbler dont le stock semble malheureusement épuisé à l'heure actuelle.

Tous les résultats des titrages sont exprimés en unités correspondant à une plage, « plaque forming units » des auteurs anglo-saxons.

4° Marche d'une expérience.

Une culture du clone KB21 en voie de développement est lavée avec une solution tampon dépourvue de calcium et de magnésium puis décollée à l'aide de versénate de sodium en solution à 0,02 p. 100 dans la même solution saline. Après une centrifugation à faible vitesse, pendant cinq minutes à 500 t/mn dans des tubes coniques de 30 ml, gra-

dués en dixièmes de millimètre, le culot est repris dans la solution tampon de Dulbecco (PBS) et l'on procède à une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment. Le liquide est soutiré et, au culot, de 0,1 ml environ, ce qui représente à peu près 10 à 12 millions de cellules KB, on ajoute 0,1 ml de la préparation virale à étudier, soit 10^4 à 10^7 particules infectieuses. La suspension cellules-virus est soigneusement mélangée par aspirations et refoulements successifs dans une pipette de 0,1 ml et la suspension mixte agitée pendant cinq minutes à la température du laboratoire. La proportion de particules adsorbées varie de 10 à 80 p. 100. On ajoute alors 20 ml de milieu LaMel et l'on centrifuge pendant cinq minutes à 500 t/mn. Le liquide surnageant est recueilli et conservé pour le titrage du virus non adsorbé. Connaissant le nombre de particules virales initiales, on aura ainsi, par différence, le nombre de particules infectieuses fixées sur les cellules. Lorsque c'est nécessaire, le culot de cellules infectées est remis en suspension en milieu LaMel, centrifugé à nouveau, et le liquide surnageant, soutiré.

A chacune des opérations, la suspension de cellules a été, sous un volume de 4 ml, soumise à 20 aspirations et refoulements successifs dans une pipette de 2 ml. Cette opération a pour but de dissocier les amas cellulaires. A la dernière manipulation, la plupart des cellules sont isolées ; il reste quelques rares groupes de deux cellules, très peu de groupes de plus de deux.

Le culot de cellules infectées et lavées est finalement repris dans 30 à 50 ml du milieu à la lactalbumine et à l'extrait de levure (milieu LaYe) renfermant 1,1 g de bicarbonate de sodium par litre : dans le mélange air/ CO_2 à 4 p. 100, le pH sera ainsi voisin de 7,3. La suspension cellulaire est ensuite répartie à raison de 8 à 10 ml dans des fioles de verre Pyrex de 100 ml, aux parois siliconées. Ces fioles, dont le goulot est rodé à l'extérieur, sont fermées, après injection d'air/ CO_2 , avec des bouchons de verre Pyrex à rodage interne. Les fioles sont alors portées dans des bains-marie à température convenable. Elles y sont fixées et maintenues à l'aide d'un dispositif simple. Dès que l'équilibre thermique est réalisé, on laisse échapper l'excès de gaz. L'ensemble du système est soumis à une agitation de 80 t/min, le mouvement excentré étant donné par l'agitateur d'un « rotary shaker » (New Brunswick Instr. Co). Le chauffage des bains-marie et le brassage de l'eau sont assurés par une unité comportant un rhéostat, un système de régulation et une hélice (« Mergotherm »). Les variations de température ne dépassent pas le vingtième de degré centigrade.

Des prélèvements sont effectués à intervalles convenablement choisis. Après chaque prélèvement, le mélange gazeux est renouvelé. Nous utilisons également un système qui permet de maintenir une légère pression positive du mélange d'air/ CO_2 (correspondant à environ 5 mm d'eau). Le dispositif permet d'effectuer des prélèvements sans sortir les fioles du bain-marie et éventuellement aussi de changer le mélange gazeux, c'est-à-dire la tension de CO_2 , en cours d'expérience.

Les cellules infectées prélevées (0,1 ml) sont introduites dans le tube d'un broyeur de Potter préalablement refroidi à 0° C et sont ensuite broyées avec un piston (verre ou Teflon) mu par un moteur. Puis on ajoute 0,9 ml de milieu LaMel et l'échantillon est conservé à — 25° C

environ dans un tube fermé par un bouchon de silicone jusqu'au moment du titrage.

Lorsqu'on veut titrer séparément le virus libre et le virus intracellulaire, les prélèvements sont bien entendu tout d'abord centrifugés et les titrages effectués, d'une part sur le liquide surnageant, d'autre part, après broyage, sur le culot cellulaire.

LE DÉVELOPPEMENT DU VIRUS DE LA POLIOMYÉLITE EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE.

1° Cinétique du développement du virus de la poliomyélite type I.

La cinétique du développement du virus de la poliomyélite a été bien étudiée par Howes et Melnick, d'une part [22], Darnell, d'autre

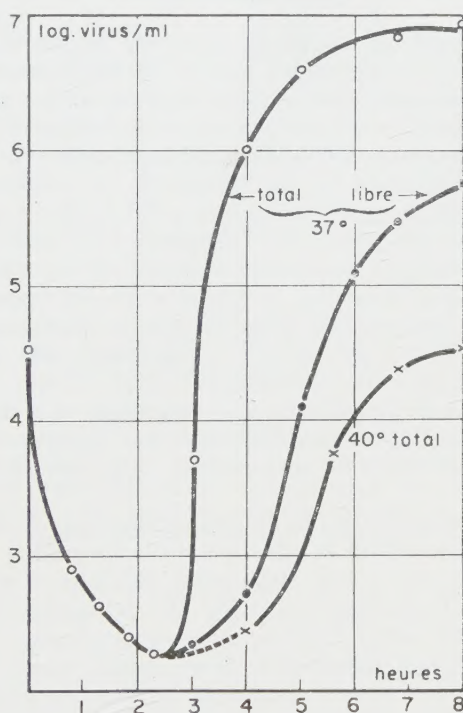


FIG. 1. — Développement du virus de la poliomyélite type I souche BEC à 37° et à 40°.

part [10]. Les courbes que nous avons obtenues sont tout à fait similaires à celles de ces auteurs, aussi bien pour ce qui concerne le virus intracellulaire que le virus libre. Cependant, un élément de précision supplémentaire a été apporté dans nos expériences

du fait que : 1° la période d'adsorption est courte (cinq minutes) ; 2° nous avons utilisé des cellules en suspension ; 3° les expériences sont faites en bain-marie et non à l'étuve. C'est pourquoi nous donnons ci-contre une courbe typique de développement.

Comme le principal de notre travail porte sur l'effet de la température, la figure 1 comprend, outre la courbe du virus total et celle du virus libre à 37°, une courbe de développement à 40°. Les courbes correspondent ici, comme dans toutes nos expériences, aux particules dénombrées par la méthode de Dulbecco, c'est-à-dire aux particules formatrices de plages.

2° Action de la température sur le développement du virus de la poliomyélite type 1.

Burnet et Lush [8] semblent avoir été les premiers à étudier l'influence de la température sur le développement viral. Leurs expériences montrent que le virus de l'ectromélie ne se multiplie dans l'embryon de poulet et ne produit de lésions que si la température est inférieure à 39° 5. Cela est vrai également pour le virus grippal qui, ainsi que l'a vu Burnet [7], se multiplie bien dans l'embryon de poulet à 36° mais non à 39° 5. Des expériences analogues ont été effectuées par Thompson et Coates [42] sur trois autres virus : herpès, vaccine et myxome. Le développement total de ces virus dans l'embryon de poulet a été déterminé à différentes températures. Les courbes montrent que le rendement est environ mille fois moindre à 40° qu'à 37°. Sigurdsson [39] a suivi pour la première fois, dans des expériences à cycle unique, la multiplication d'un virus en fonction de la température et a donné de belles courbes de développement du virus de la stomatite vésiculeuse : le rendement final à 39-40° est environ 1 p. 100 du rendement à 35-36°.

Pour déterminer l'effet de la température sur le développement viral, nous avons établi la cinétique de la formation des particules infectieuses sur une même suspension cellulaire à différentes températures (v. Techniques, p. 175). On détermine ainsi le rendement maximum pour chacune des températures envisagées. Au cours d'une même expérience, nous avons opéré, selon le cas, selon surtout l'équipement dont nous disposions, à trois, quatre ou cinq températures différentes. Pour chacune des souches virales mises en œuvre, il existe une zone de température correspondant à un développement maximum. Au-delà et en deçà de cette zone optimum, le rendement est diminué. Dans ce mémoire ne seront considérées que les températures supérieures à la zone optimum. Le développement aux températures inférieures, qui pose une série de problèmes particuliers, sera examiné dans une publication séparée [20].

Il est commode d'exprimer le rendement en pourcentage du rendement maximum. Si l'on examine par exemple la courbe BEC de la figure 5, on voit que le rendement est notablement réduit aux températures élevées. Cette diminution du rendement ne correspond pas pour autant à une inactivation des particules infectieuses. Dans les conditions de nos expériences, il n'y a pas en effet, en quelques heures, de baisse mesurable du titre des particules infectieuses libres entre 37 et 41° (v. tableau I).

TABLEAU I.

Témoin	118-122,	moyenne : 120
37° , 2 h	115-140,	" 128
- , 4 h	108- 98,	" 103
38°5, 2 h	102-103,	" 103
- , 4 h	115-122,	" 119
40° , 2 h	113-108,	" 111
- , 4 h	109-102,	" 106
41° , 2 h	120-123,	" 122
- , 4 h	112-121,	" 117

Une suspension de virus (souche VS ayant subi 14 passages à 35° sur cellule KB) est répartie en tubes qui sont soit placés immédiatement à 0°, soit répartis dans des bains-marie à diverses températures. L'un des tubes est refroidi après deux heures, l'autre après quatre heures. La dilution a été choisie de telle sorte que le titrage est effectué sur 0,1 ml de la suspension originelle. Les chiffres correspondent donc ici au nombre de particules infectieuses pour 0,1 ml.

Ajoutons que, d'une expérience à une autre, on retrouve des chiffres sensiblement voisins. On en donne comme exemple les résultats de trois essais différents effectués avec la souche Brunhilde-Enders-Chimpanzé (BEC) au deuxième passage à 41° C. Les chiffres représentent les pourcentages du rendement à 37° : 39° : 63, 50, 51 ; 40° : 10, 14, 14 ; 41° : 1,7, 1,5 et 2,1.

3° Mécanisme d'action des températures élevées.

La diminution du rendement aux températures élevées n'étant pas due à une inactivation des particules infectieuses, il importait de connaître son mécanisme. Ainsi qu'on le verra plus loin, certains variants du poliovirus se développent fort bien à 39°, 40° et

même 41°. Le défaut de développement de la souche BEC à ces températures n'est donc pas lié à une perturbation du métabolisme

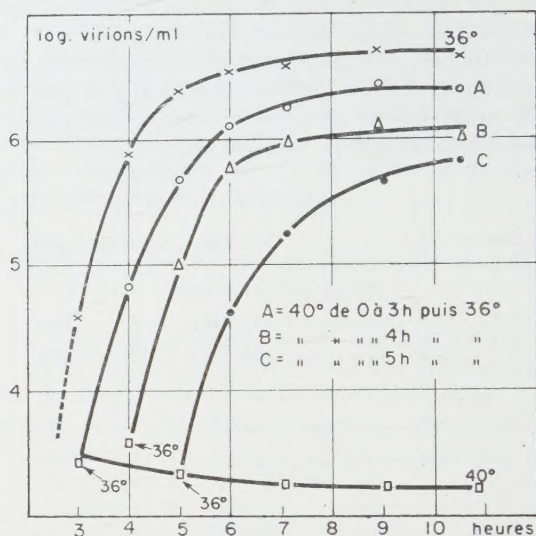


FIG. 2. — Effet d'un séjour de durée variable à 40° C sur le développement du poliovirus de type I souche VS (LSc2ab) à 36°, à pH 7,3. On notera : a) que le titre 10^5 après un séjour de trois, quatre et cinq heures à 40° et transfert à 36° est atteint respectivement une heure, deux heures et trois heures trente plus tard que dans la suspension placée à 36° dès le début ; b) que le rendement final à 36° après trois, quatre et cinq heures de séjour initial à 40° est respectivement 50, 24 et 13 p. 100 du rendement à 36°.

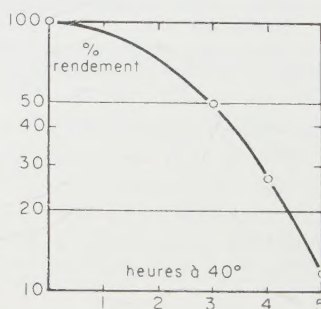


FIG. 3. — Rendement relatif après trois, quatre et cinq heures à 40° (voir expérience représentée sur la figure 2) du poliovirus type I, souche chaude VS 41 (9).

cellulaire. Il est dû probablement à la sensibilité thermique d'une ou de plusieurs phases du développement viral. Pour déterminer

cette phase, nous avons étudié, d'une part, le développement à 36-37° après séjour à 40°, d'autre part, le développement à 40° après séjour à 36-37°.

L'examen des figures 2, 3 et 4 montre que le rendement final est d'autant moins élevé que le séjour initial à 40° a été plus long.

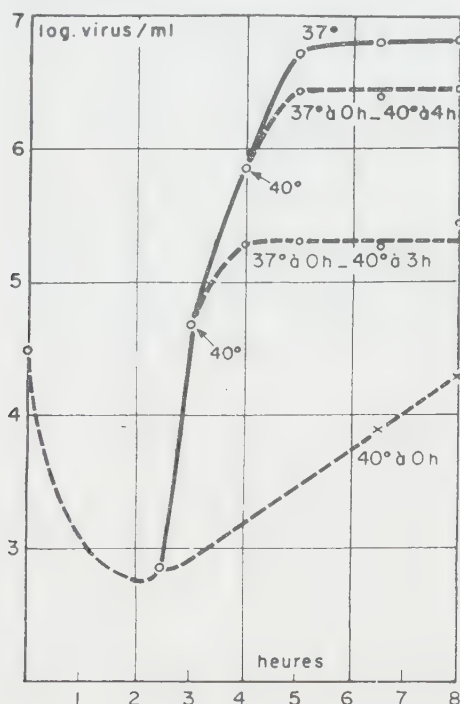


FIG. 4. — Effet d'un transfert à 40° C après trois et quatre heures à 37° sur le développement du poliovirus type I, souche BEC. On notera : a) qu'entre trois et quatre heures, le nombre de particules infectieuses est passé de 5.10^4 à 7.10^5 à 37°, et à 2.10^5 à 40° ; il y a donc eu formation à 36 et à 40° respectivement de $6,5.10^5$ et de $1,5.10^5$ particules infectieuses ; b) qu'entre quatre et cinq heures, le nombre de particules infectieuses est passé de 7.10^5 à 5.10^6 à 37°, et à $2,8.10^6$ à 40° ; il y a donc eu formation à 37 et à 40° respectivement de $4,3.10^6$ et $2,1.10^6$ particules infectieuses.

L'examen des deux courbes de gauche de la figure 2 est particulièrement instructif. L'une de ces courbes correspond au développement à 36°, l'autre, au développement à cette même température après trois heures de séjour à 40°. On voit que pour le titre 10^5 le retard est d'une heure environ, et d'une heure et demie pour le

titre 10⁶. Durant les trois premières heures de séjour à 40°, le développement viral s'est donc déroulé, quoique à vitesse ralentie.

L'examen de la figure 4 révèle qu'après transfert de 37° à 40°, il y a formation d'un petit nombre seulement de particules infectieuses, formation qui est rapidement bloquée par la suite.

L'ensemble de ces expériences laisse à penser que c'est une phase tardive du développement viral qui est particulièrement affectée par les températures élevées.

4° Etude comparative de diverses souches du virus de la poliomyélite type I.

Nous avons étudié comparativement une série de souches de poliovirus type I :

- 1° La souche Brunhilde-Enders-Chimpanzé ou BEC ;
- 2° Le vaccin oral d'Albert Sabin, souche LSc2ab, ou VS ;
- 3° Le vaccin oral de Hilary Koprowski, souche Chat, ou VK ;
- 4° Une souche Mahoney (que nous devons à l'obligeance de Paul Tournier) ou M ;

5° Enfin les variants « chauds » des souches BEC et VS (LSc2ab), et un variant « froid » de la souche BEC. Tout ce qui concerne les variants « chauds » est exposé plus loin.

D'après les courbes de la figure 5, on peut déduire que les diverses souches étudiées sont inégalement sensibles aux températures élevées. Le développement des deux souches vaccinales, VS et VK, est inhibé à 99 p. 100 pour une température de 39° 3, alors que la souche Mahoney a encore un rendement de 2 p. 100 à 41°. La souche BEC occupe une position intermédiaire. La comparaison de la sensibilité thermique des souches vaccinales et de la souche Mahoney suggérerait l'existence d'une relation entre thermosensibilité et virulence. Nous avons alors cherché à obtenir, à partir des souches BEC et VS, des variants se comportant comme la souche Mahoney, c'est-à-dire à développement relativement thermorésistant.

Obtention de variants « chauds ».

Si l'on infecte avec 10⁵ particules infectieuses de la souche VS (vaccin oral d'Albert Sabin) une culture de cellules KB renfermant environ deux millions de cellules, on observe à 36° une dégénérescence totale en vingt-quatre à trente-six heures à la condition que l'aération soit suffisante et que le pH ne descende pas au-dessous de 7,00. Si la culture infectée est maintenue à 41°, il n'y a pas dégénérescence visible après deux ou trois jours. Le virus ne se développant pas à 40°, ce résultat n'est pas pour surprendre.

Il apparaissait ainsi que, dans les conditions où nous opérons, il n'est pas possible d'espérer obtenir, en une seule étape, l'isolement d'un variant capable de se développer à 41°. Il a donc été procédé à des passages successifs à température régulièrement croissante : 38°3 (1), 39° (1), 39°4 (2), 39°6 (2), 40° (4), 40°5 (3), 41° (9) [le chiffre entre parenthèses correspond au nombre de pas-

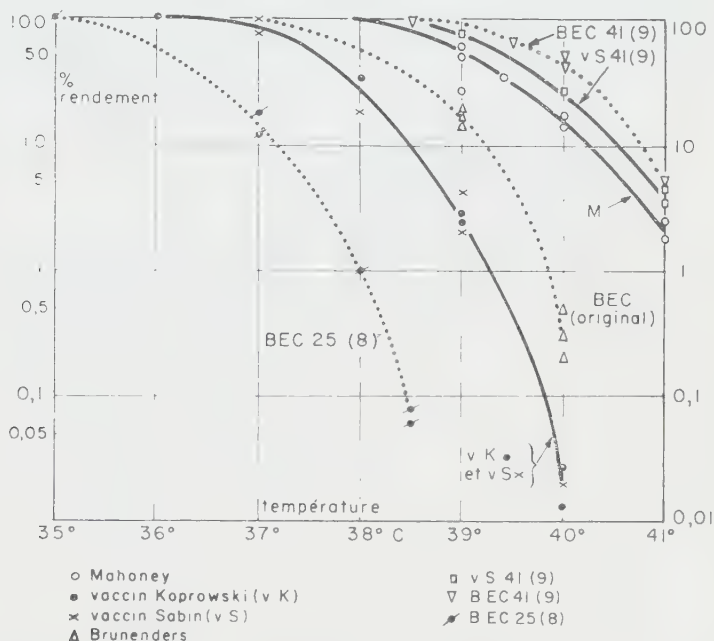


FIG. 5. — Développement de quelques souches de poliovirus type I en fonction de la température. En abscisses, la température durant le développement ; en ordonnées, le pourcentage du rendement maximum. Les chiffres qui suivent la spécification de la souche correspondent, le premier à la température à laquelle la souche cellulaire a été cultivée, le second, entre parenthèses, au nombre de passages à cette température. BEC : Brunhilde-Enders-Chimpanzé. La courbe correspondant à la souche « froide » [BEC 25 (8)], d'après Groman, Lwoff et Lwoff. M : Mahoney ; VK : vaccin oral de Koprowski (souche Chat) ; VS : vaccin oral de Sabin (souche LSc2ab). On n'a pas représenté la courbe de la souche du type II, MEF₁, hautement virulente pour la souris, qui coïncide avec la courbe VS 41 (9).

sages à la température indiquée]. Lorsque l'on passe d'une température donnée à une température plus élevée, la dégénérescence cellulaire, dans les conditions de nos expériences, est d'abord lente (soixante-douze heures), puis se produit plus rapidement (cinquante-cinq heures, quarante-huit heures, trente-six heures, vingt-quatre heures). Le titre en virus d'abord très bas, 10^3 à 10^4 par

millilitre, augmente au fur et à mesure des passages pour atteindre 2 à 8.10⁶. Le développement plus rapide et le titre plus élevé ne peuvent correspondre qu'à la sélection d'un variant « chaud ».

L'effet de la température sur le développement de la souche VS après neuf passages à 41° — souche 41 (9) — est indiqué sur la figure 5 ainsi que la sensibilité thermique d'un variant « chaud » obtenu à partir de la souche BEC. On voit que les deux variants « chauds » sont moins affectés par les hautes températures que la souche Mahoney (M). La figure 6 donne l'évolution de la sensibilité

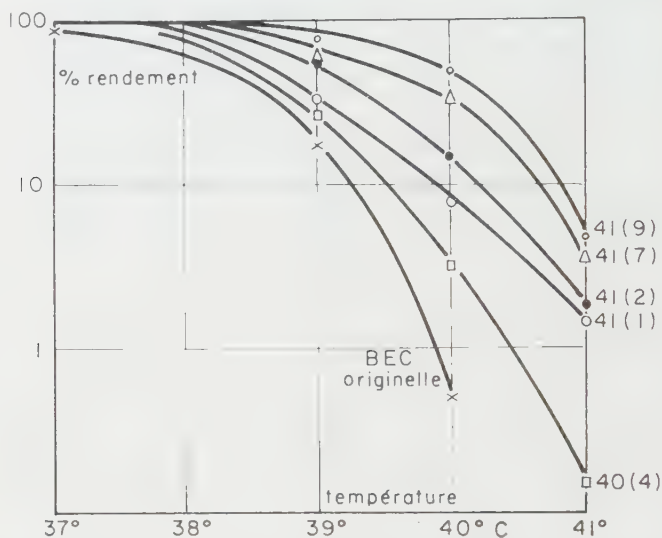


FIG. 6. — Evolution de la sensibilité thermique au cours de l'isolement d'un variant « chaud » (souche BEC). En abscisses, la température en degrés C. En ordonnées, aux diverses températures, le pourcentage du rendement obtenu à la température optimum : 36° pour la souche originelle, 37° pour les variants « chauds » de cette souche.

thermique au cours de l'isolement d'un variant « chaud » de la souche BEC.

L'inconvénient de la technique d'isolement des variants « chauds » est l'impossibilité de déterminer le nombre d'étapes mutationnelles impliquées dans le processus de sélection. Nous n'avons pas cherché à obtenir des plages en milieu gélosé à température élevée. Il sera évidemment nécessaire de mettre au point une technique permettant la production de plages à haute température, qui seule permettra de déterminer la fréquence et le nombre des mutations en jeu dans un changement donné de sensibilité thermique. En

l'absence de toute donnée de cet ordre, nous sommes réduits à des hypothèses. Le fait que des passages nombreux ont été nécessaires pour obtenir un variant de la souche originelle VS (LSc2ab) se développant bien à 41° permet de supposer que la transition est liée à de nombreuses mutations, nous serions tentés de dire au moins cinq.

Ainsi qu'on le verra par la suite, il existe une corrélation entre le degré de thermorésistance et le degré de neurovirulence. Le fait que les vaccinations par vaccins vivants sont appelées à se développer rend très souhaitable une analyse précise de la variation thermosensibilité $\longleftrightarrow$ thermorésistance.

THERMOSENSIBILITÉ ET NEUROVIRULENCE.

La notion d'un lien entre la sensibilité du développement viral à la température et la neurovirulence est toute récente. Dubes et Chapin [41] ont cultivé le virus poliomyélitique (type I Akron, type II Brooks et type III Mabie) à 30° et constaté que les variants ainsi obtenus se multipliaient moins bien ou pas du tout à 36°, et que la souche Mabie « froide » était moins virulente que la souche originelle. Ces travaux ont été poursuivis et complétés par Dubes et Wenner [42] qui ont sélectionné des variants par culture à 23°. Après sept passages à cette température, les virus étaient « déadaptés » à 37°. La neurovirulence des souches des types I et II avait notablement diminué, cependant que la souche Mabie du type III se révélait totalement dépourvue d'activité pathogène pour le système nerveux. Dubes et Wenner ont fait remarquer que la température normale du singe étant 39°, la diminution de virulence pour cet animal pourrait être due à une incapacité du virus de se multiplier à une température aussi élevée. L'on ne peut qu'exprimer son accord avec ces conclusions. L'analyse de la neurovirulence en relation avec la thermosensibilité va révéler toutefois que la situation est probablement plus complexe.

La détermination de la neurovirulence de nos souches a été faite par injection de doses diverses de virus dans le système nerveux de singes, cerveau ou moelle épinière (Sabin et Lwoff [37]). Les résultats ayant été discutés en détail, il est inutile de les répéter ici. Le tableau II en met l'essentiel en évidence. On y voit que la souche BEC, après huit passages à froid — BEC 25 (8) — a perdu totalement sa virulence originelle par la voie médullaire.

Les résultats sont particulièrement frappants pour la souche vaccinale LSc2ab ou VS qui, dépourvue de neurovirulence à l'origine, est devenue hautement virulente après neuf passages à 41° : 4 particules infectieuses provoquent, par voie intracérébrale, paralysie et prostration, alors que 10⁸ particules de la souche originelle sont sans effet visible.

TABLEAU II. — Thermosensibilité, vitesse de développement et neurovirulence de quelques souches de poliovirus type I.

	Température à laquelle le rendement maximum est diminué de 95 %	Rendement à 39° % du maximum	Temps nécessaire pour rendement 50 % à 37°	Neurovirulence*
BEC 41(9)	41	90	4 h	+
VS 41(9)	40,9	80		+
Mahoney	40,6	50	4 h 30	+
BEC originale	39,5	17	5 h 15	+
VS (original) Vaccin Sabin	38,8	3	5 h 30	0
VK - Vaccin Koprowski	38,8	3	5 h 30	0
BEC 25(8)	37,5	<0,1	7.- 10 h	0

(*) Le signe + correspond à une neurovirulence élevée par voie intraspinale et intracérébrale chez le singe, le signe 0 à une absence totale de virulence. Le développement de la souche MEF₁ (type II), hautement virulente pour la souris, présente la même thermosensibilité que celui de la souche VS 41 (9).

On peut se demander si l'augmentation de la neurovirulence est liée à la culture à température élevée ou bien au simple passage sur cellule KB. L'expérience montre que 14 passages en série sur cellule KB à 36° des souches BEC et VS originelles ne modifient pas leur neurovirulence. L'augmentation de la neurovirulence par passages à haute température sur cellule KB est donc bien le fait de la sélection de variants à développement thermorésistant.

Ajoutons qu'une souche MEF₁ du type II [38], hautement virulente pour la souris par la voie intracérébrale, se comporte comme la souche virulente du type I : son développement est thermorésistant. En fait, la courbe de la souche MEF₁ coïncide avec celle de la souche VS 41 (9) telle qu'elle est représentée sur la figure 5. Il est intéressant de noter que la thermosensibilité du développement de deux souches vaccinales du type I, isolées respectivement par Koprowski et Sabin, est identique. Si l'on veut bien considérer que ces souches n'ont pas été obtenues par sélection de variants à

basse température, cette coïncidence ne paraîtra pas fortuite. Elle sera discutée ultérieurement.

Les études sur la thermosensibilité comparée de souches des types II et III, virulentes et vaccinales, ont été à peine ébauchées. Les expériences préliminaires ont montré une grande sensibilité des souches vaccinales II et III aux températures élevées [37].

Toutes les données sont actuellement concordantes : la thermosensibilité du développement viral des souches vaccinales sélectionnées pour leur absence de neurovirulence est élevée. La thermosensibilité des souches neurovirulentes est faible. Avant de pouvoir affirmer la généralité de cette corrélation, il sera nécessaire de déterminer la thermosensibilité du développement de nombreuses souches de neurovirulence connue. Cette détermination pose obligatoirement des problèmes d'ordre pratique. Il ne saurait être question de suivre la courbe du développement d'un grand nombre de souches à plusieurs températures. En discutant les divers aspects du problème avec Albert Sabin, nous avons abouti à la conclusion que, pour un travail de dégrossissement, le plus simple serait de mesurer le rendement comparé, après huit heures, à 36°, 38°5, 39°5 et 40°5, ou au moins à 36° et 39°5. Les points ainsi obtenus, portés sur le graphique de la figure 5 donneront une idée de la thermosensibilité du virus en cause.

L'examen de cette figure 5 révèle que chaque souche de virus possède sa thermosensibilité propre. Le fait qu'une population de cellules sera ou non détruite par un virus à une température donnée, et aussi la vitesse de destruction, dépendent en dernière analyse de la valeur du rapport du nombre de particules infectantes au nombre de particules produites. La détermination du temps nécessaire pour la destruction d'une culture en fonction de la température fournit évidemment une indication relative à la thermosensibilité. Toutefois, seule la courbe du rendement au cours d'un cycle unique peut procurer une mesure de la sensibilité du développement viral à une température donnée.

Pour ce qui concerne les souches « froides », les constatations de Sabin et Lwoff confirment entièrement celles de Dubes et Wenner, et le défaut de neurovirulence peut être attribué, conformément aux conclusions de Dubes et Wenner, à l'incapacité de développement à 39°, température moyenne normale du macaque. Il est évident qu'un virus ne saurait être virulent pour un animal dont la température correspond à une inhibition totale du développement viral.

Cependant, les deux souches vaccinales du type I, celle de Koprowski aussi bien que celle de Sabin, se développent parfaitement à 37° et donnent encore un rendement de 2 p. 100 à 39°. Elles se révèlent pourtant dépourvues de virulence pour le singe, par inoculation intramédullaire, et pour l'homme, par voie orale. La

neurovirulence et probablement la virulence tout court ne dépendent donc pas exclusivement de la relation entre thermosensibilité du virus et température de l'animal. Le problème sera discuté de nouveau à la fin de ce mémoire lorsque aura été examiné l'effet du pH sur le développement viral.

Pour le moment, contentons-nous d'examiner la figure 7. On y voit que la vitesse de multiplication est d'autant plus élevée que la souche est plus thermorésistante. Corrélativement, la phase d'éclipse est plus courte. Enfin, il est un autre caractère sur lequel nous voudrions attirer l'attention. Le rendement moyen de la souche

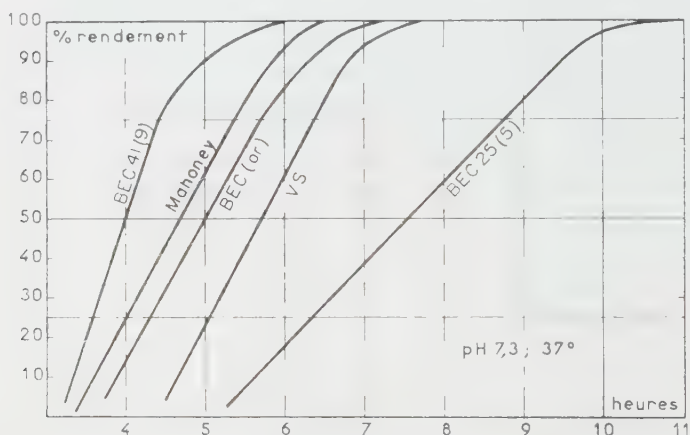


FIG. 7. — Vitesse de développement comparé de diverses souches de virus de la poliomyélite, type I, d'après les courbes de développement au cours d'un cycle unique. On notera que le point 50 p. 100 est atteint d'autant plus vite que la souche est plus « chaude ». BEC : souche Brunhilde-Enders-Chimpanzé. VS : vaccin de Sabin LSc2ab.

vaccinale VS originelle est en général de 100 à 200. Il tombe rarement à 50 et n'a pas dépassé 500 dans les conditions où nous opérons. Le rendement de la souche « chaude » VS 41 (9) varie entre 1 000 et 2 500 et celui des autres souches thermorésistantes est également élevé. Dunnebacke et Reaume [14], qui ont déterminé le rendement en particules infectieuses de cellules isolées, ont constaté que celui-ci est d'autant plus élevé que le volume cellulaire est plus grand. Le rendement que nous mesurons est un rendement moyen. Le fait que, d'une expérience à l'autre, il puisse varier dans des proportions importantes, et que nous ignorions le déterminisme de ces variations, nous incite à beaucoup de prudence. Nous nous contenterons de dire ceci : notre impression est que les souches « chaudes » ont un rendement plus élevé que les

souches « froides ». Il serait de toute façon important d'étudier comparativement de nombreuses souches « chaudes » et « froides » afin de savoir si cette impression correspond à la réalité. Quoi qu'il en soit, l'existence d'une corrélation entre thermorésistance et vitesse de multiplication semble hors de doute, et le problème d'une corrélation entre rendement élevé d'une part, thermorésistance et vitesse de multiplication d'autre part, est posé.

INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU SUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA POLIOMYÉLITE.

Certaines souches de virus poliomyélitique forment des plages aussi bien en milieux « normaux » (à teneur normale en bicarbo-

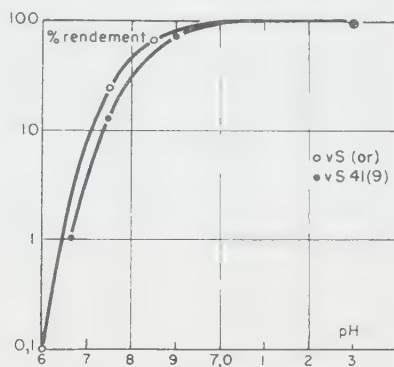


FIG. 8. — Développement, en fonction du pH à 37°, de deux souches de virus poliomyélitique du type I : la souche VS originelle et le variant VS 41 (9).

nate de sodium) qu'en milieux acides (à teneur réduite en bicarbonate). D'autres au contraire produisent moins de plages dans les milieux normaux que dans les milieux acides (Dulbecco et Vogt [43]). Le développement viral suivi au cours d'une expérience à cycle unique s'étant révélé le même à pH 6,8 et 7,4, Vogt, Dulbecco et Wenner [43] ont conclu qu'en milieu acide les cellules devaient être modifiées lentement et qu'un délai de plus de huit heures était nécessaire pour que la modification devienne incompatible avec le développement viral.

L'étude de l'influence du pH sur le développement de la souche vaccinale VS (LSc2ab) [v. fig. 8] révèle qu'à pH 6,8, le développement viral n'est en effet que peu diminué. En revanche, entre pH 6,8 et pH 6,6 l'effet est considérable. Le rendement à pH 6,6 n'est que 0,1 p. 100 du rendement maximum. La courbe de sensibilité au pH varie quelque peu selon les souches (v. fig. 9 et 10),

mais de façon constante la courbe s'infléchit aux environs de pH 6,9-6,8. Les courbes correspondant à des expériences à cycle unique, l'effet d'une acidification du milieu devait être rapide. L'expérience représentée sur la figure 11 révèle qu'il est quasi

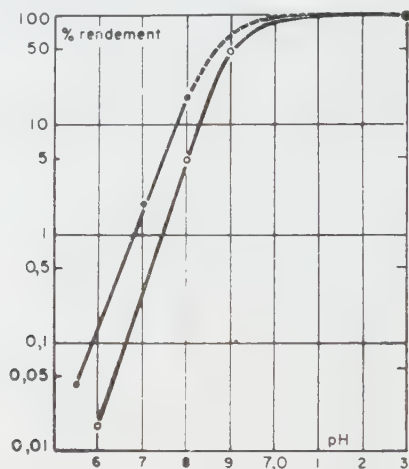


FIG. 9. — Développement, en fonction du pH à 37°, du virus poliomyélitique type I, souche BEC.

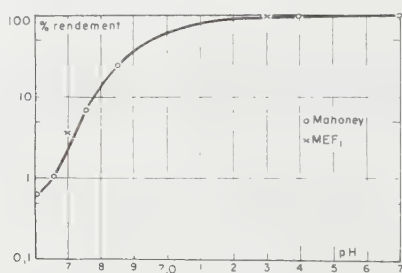


FIG. 10. — Développement, en fonction du pH à 37°, du virus poliomyélitique type I, souche Mahoney. Deux points (pH 6,7 et 7,3) correspondent au type II, souche MEF₁.

immédiat : sur la courbe de gauche on voit qu'entre 3 et 4 heures le nombre de particules infectieuses a augmenté d'environ $4.8.10^6$ à pH 7,3, de 10^5 seulement à pH 6,6, le point de départ, à 3 heures, ayant été le même. La courbe de gauche montre qu'un séjour de trois heures à pH 6,6 n'empêche pas la production de virus à vitesse normale après retour à pH 7,3.

Ajoutons que les courbes de développement en fonction du pH sont parallèles à 37° et à 39° : les effets de l'acidité et de la température sont donc additifs. Si à une température donnée le développement est inhibé de 90 p. 100 et, à un pH donné, de 90 p. 100

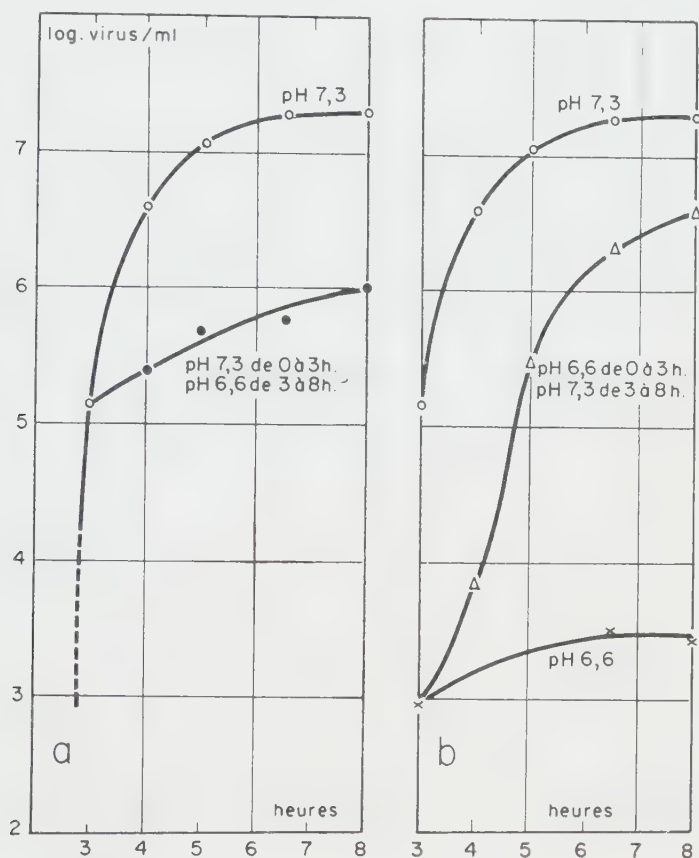


FIG. 11. — Effet d'un changement de pH sur le développement à 37° du virus poliomyélique type I, souche BEC. a) Après trois heures à pH 7,3, un changement de la tension de CO_2 fait passer le pH à 6,6; on voit que l'effet est immédiat. b) Après trois heures à pH 6,6, on fait passer le pH à 7,3 par changement de la tension de CO_2 : ici aussi l'effet est immédiat.

également, les effets combinés de la température et de l'acidité entraîneront une diminution de 99 p. 100. On le verra, cette remarque est importante pour la compréhension du rôle de la réaction inflammatoire dans l'évolution de l'infection virale.

*Corrélation entre neurovirulence et sensibilité à la réaction
du milieu.*

Vogt, Dulbecco et Wenner [43] ont remarqué que les souches de poliovirus qui donnent le même nombre de plages en milieu normal et en milieu acide sont en général neurovirulentes ; celles qui donnent un nombre de plages moindre en milieu acide qu'en milieu normal sont toujours dépourvues de virulence pour le système nerveux. L'existence de cette corrélation a dans ses grandes lignes été confirmée par Sabin [36] et par Hsiung et Melnick [23]. Cependant, Sabin aussi bien que Hsiung et Melnick ont trouvé qu'une mutation vers la résistance à l'acidité n'est pas nécessairement associée à un changement de neurovirulence. Ce que nous avons appris concernant les relations entre sensibilité thermique et neurovirulence montre que le caractère « thermorésistance » est au moins aussi important que le caractère « acidorésistance ». Une souche acidorésistante « froide » a toute chance d'être dépourvue de neurovirulence. L'acidorésistance du développement viral n'est que l'un des caractères gouvernant la neurovirulence.

DISCUSSION.

Nous avons étudié jusqu'ici l'influence de la température et de la réaction du milieu sur le développement du virus dans des cellules *in vitro*. Dans quelles conditions le virus se développe-t-il dans l'animal ?

Le problème de la température est simple. La plupart des infections virales sont accompagnées de fièvre. On sait, grâce à Atkins et Huang [3 bis] que celle-ci est causée par une substance pyrogène libérée par certaines cellules de la zone inflammatoire. En raison de l'élévation générale de la température, ou d'une élévation locale dans le cas d'un processus inflammatoire, le développement viral se trouvera inhibé. Le degré d'inhibition dépendra de la température au point où le virus se développe et de la sensibilité propre du virus, c'est-à-dire de sa constitution génétique.

Pour ce qui concerne la réaction du milieu, la situation est plus difficile à analyser parce que, aussi curieux que cela puisse paraître, le pH interne des cellules nerveuses de mammifères n'a pas encore été mesuré. Des déterminations ont été faites chez les mollusques par Arvanitaki et Chalazonitis [2, 3]. L'on a appris ainsi que le pH de l'axoplasme du neurone géant de *Sepia* (la seiche) est de 6,6 et que celui du somatoplasme du neurone d'*Aplysia* (la vache de mer) varie de 6 à 6,4. L'on sait aussi qu'une augmentation de la tension de CO₂ à 10 p. 100 fait passer le pH à 5,5-5,4

en trois à cinq minutes. Il serait très important de connaître le pH des neurones cérébraux et médullaires de mammifères et de savoir dans quelle mesure il est modifié par le milieu intérieur pathologique. Le pH d'une zone inflammatoire mesuré directement par Frunder [18, 19] peut atteindre 6,5 et même 5,5. Cette baisse est le résultat conjugué de l'accumulation de cellules dans la zone infiltrée, de la diminution de la tension d'oxygène et de l'augmentation de la glycolyse qui en est la conséquence, du défaut d'élimination du CO_2 et de l'accumulation d'acide lactique dont la concentration peut atteindre 2,5 g par litre. On sait depuis le travail classique de Hurst [24] que, très peu de temps après la mort d'une cellule atteinte par le virus de la poliomyélite, des leucocytes polymorphes diffusent dans le tissu atteint et s'accumulent autour de la cellule infectée. Cette accumulation doit entraîner une diminution de pH dans la microzone où le virus s'est développé. De plus, les cellules infectées par certains virus produisent plus d'acide lactique que les cellules normales ainsi que l'ont vu Levy et Baron [28], Fischer et Ginsberg [17].

Une réaction inflammatoire intense, comme celle que l'on observe si souvent dans le système nerveux au cours de l'infection poliomyélitique engendrera donc des conditions hautement défavorables à la multiplication virale. L'inflammation périvasculaire aboutit parfois à la formation d'un épais manchon. Elle peut aussi n'être qu'insignifiante, précisément, ainsi que l'a noté Hurst [24], dans les infections par les souches les plus virulentes. Si la baisse de pH, conséquence de la réaction inflammatoire, est vraiment l'un des facteurs responsables de la diminution ou de l'arrêt de la multiplication virale, on conçoit que des souches ne déclenchant pas cette réaction — quelle que puisse être la raison de ce défaut — possèdent un pouvoir de multiplication et d'envahissement élevé. On conçoit aussi que des substances comme la cortisone (v. la revue de Thomas [40]), qui diminuent ou suppriment la réaction inflammatoire, favorisent le développement viral et aggravent la maladie ou même en gouvernent l'éclosion.

Il semble bien établi par les travaux de Hurst [24] et de Bodian [5] que des neurones infectés par le virus de la poliomyélite sont susceptibles de guérison. A notre connaissance, des guérisons en culture de cellules infectées n'ont jamais été observées. Il est évidemment difficile de comparer des espèces cellulaires aussi dissemblables qu'une cellule épithéliale maligne et un neurone, étudiées dans des conditions de milieu très différentes. De toute manière, la nature des facteurs qui gouvernent le sort d'une cellule nerveuse infectée par un virus nous échappe entièrement. On sait que les cellules des cornes postérieures de la moelle épinière sont moins sensibles au poliovirus que les cellules des cornes antérieures, que les neurones cérébraux sont en règle générale moins

sensibles que les neurones médullaires. On peut supposer que nombre de cellules nerveuses sont à la limite de la sensibilité parce que les conditions qui y règnent sont à la limite de celles qui permettent le développement viral. Une faible modification du métabolisme cellulaire ou du milieu péricellulaire pourrait ainsi empêcher le développement viral. Il serait en tout cas important d'obtenir quelque lumière sur les facteurs qui déterminent l'avenir d'une cellule infectée et orientent l'infection vers la mort ou la guérison.

Considérons donc une espèce virale pathogène. Une souche de cette espèce aura d'autant moins de possibilité de se développer et sera donc d'autant moins pathogène qu'elle sera plus sensible aux réactions non spécifiques de l'organisme infecté. Une souche particulièrement sensible aux températures « élevées » et à un milieu acide sera peu virulente. Bien entendu, la résistance du développement viral aux températures élevées et à l'acidité du milieu n'est pas le seul facteur dont dépende la virulence. Pour qu'un virus puisse exercer une action pathogène, il est nécessaire qu'il soit adsorbé par certains types cellulaires. Les génotypes et phénotypes cellulaires aussi bien que viraux entrent en jeu. De plus, le milieu intérieur, normal ou pathologique, ne diffère pas seulement par le pH et la température. Le métabolisme cellulaire dans une zone inflammatoire pourrait entraîner la production de substances virostatiques. Le développement viral lui-même provoque la production et la libération de substances inhibant la multiplication du virus. Une substance voisine de l'« interféron » de Isaacs et Lindenmann [25] a été mise en évidence par Ho et Enders [21] dans les cultures de virus de la poliomyélite, et l'hypothèse envisagée par ces auteurs de son rôle possible dans les mécanismes de défense au cours de la phase aiguë de la maladie virale. L'hypothèse d'une production d'inhibiteurs viraux non spécifiques au cours de la réaction inflammatoire a d'ailleurs été émise déjà par Bodian dans son exposé général sur les aspects physiologiques des infections poliomyélitiques [6].

Le lecteur aura peut-être été surpris de ne pas voir les anticorps mentionnés au cours de cette discussion. Mais on sait, précisément grâce à Bodian [6], que la présence d'anticorps, même à titre élevé, n'empêche pas la transmission, de cellule à cellule, du virus de la poliomyélite une fois que celui-ci a réussi à pénétrer dans le système nerveux. D'ailleurs, même pour empêcher la propagation du poliovirus dans des cultures de cellules subconfluentes, il faut une concentration relativement élevée d'anticorps (Lwoff et Lwoff,

in Lwoff [29]). Bien entendu, il n'est pas question de dénier aux anticorps le rôle important qu'ils jouent certainement dans l'immunité antivirale et tout spécialement dans l'infection poliomyélitique où ils neutralisent les particules infectieuses passées dans la circulation, s'opposant ainsi à l'infection du système nerveux central. Cependant, au cours d'une primo-infection, la formation des anticorps est relativement tardive et le sort de l'animal semble bien souvent décidé avant que les anticorps n'aient atteint un taux suffisant pour jouer un rôle déterminant dans l'évolution de la maladie. Tout facteur non spécifique diminuant la vitesse de multiplication du virus gênera l'instauration de lésions trop graves avant que le taux critique en anticorps soit atteint. Tout caractère viral augmentant la résistance du virus à l'action de ces facteurs non spécifiques sera corrélatif d'une augmentation de virulence.

La thermorésistance, il convient d'insister sur ce point, n'est que l'un des caractères qui permettent à un virus de se développer chez un animal fébricitant. Une souche thermosensible à fort rendement individuel pourrait se multiplier à température élevée. On ne doit donc pas s'attendre à une corrélation constante entre thermorésistance et virulence. Toute souche thermorésistante ne sera pas fatalement virulente et *vice versa*. D'ailleurs les souches vaccins, celle de Koprowski comme celle de Sabin, toutes deux avirulentes et thermosensibles, ont été obtenues sans que, semble-t-il, une température basse soit intervenue en tant qu'agent sélecteur. La thermosensibilité, nous l'avons dit, pourrait être liée à d'autres caractères viraux. Et il convient de noter ici que nous ignorons tout du milieu qui environne les cellules du tube digestif où le virus de la poliomyélite se reproduit. Le régime alimentaire, la flore du tractus intestinal pourraient, en tant que facteurs modifiant le milieu, jouer indirectement un rôle dans la sélection de certains types de variants. Le problème est on le conçoit fort complexe mais mérite cependant d'être abordé en raison de l'importance des virus intestinaux. Quoi qu'il en soit, la thermorésistance n'est, répétons-le, que l'un des caractères conférant au virus la possibilité de dominer les conditions adverses engendrées par les réactions non spécifiques de l'organisme infecté.

★ ★

L'existence d'une corrélation entre thermosensibilité du développement viral et neurovirulence d'une part, l'obtention de souches neurovirulentes par sélection de variants à développement thermorésistant, d'autre part, nous a conduits à considérer le rôle des facteurs non spécifiques dans l'évolution des infections virales et à analyser le système virus-cellule et cellule infectée-organisme. De nombreuses données viennent à l'appui de la thèse selon

laquelle la résistance du développement viral aux réactions non spécifiques de l'hôte est parmi les composantes importantes de la virulence et, corrélativement, que les réactions non spécifiques sont parmi les facteurs importants qui déterminent le sort de l'organisme infecté.

L'hyperpyrexie exerce on le sait une action favorable sur l'évolution de quelques maladies virales chez les animaux. C'est le cas, pour le lapin, du myxome [41, 35] et, pour la souris, de l'herpès [4], de la cocksakiose [44] et de la poliomyélite [33]. D'une manière générale, une température élevée favorise la disparition du virus et la survie de l'animal. Une température basse au contraire favorise la multiplication du virus et entraîne la mort de l'hôte. Les expériences de Walker et Boring [44] sur l'infection de la souris par le virus de Cocksackie sont, à cet égard, particulièrement démonstratives. L'ensemble des données ont déjà été discutées dans la revue de Lwoff [29] où est mentionné également le problème de l'influence de la température sur les infections virales des végétaux (v. revue de Kassanis [26]). Nous voudrions cependant revenir sur le cas du myxome du lapin.

Les expériences de Thompson ont été reprises par Marshall [34]. L'évolution de la maladie provoquée par une souche hautement virulente du virus du myxome n'a pas été influencée par les températures élevées. En revanche, les infections engendrées par une souche atténuée sont orientées vers la guérison par les températures hautes, vers la mort par les températures basses : la mortalité, chez les animaux maintenus au chaud, à la température normale, et à froid, a été respectivement 30, 63 et 92 p. 100. Rappelons que le virus du fibrome de Shope, peu virulent pour le lapin, ne se développe pas au-dessus de 38°, contrairement à celui du virus du myxome (souches virulentes) qui se multiplie à 40°. De plus, le virus du fibrome se multiplie plus lentement et atteint un titre moins élevé que le virus du myxome (Kilham [27]). Il serait important de comparer systématiquement la sensibilité thermique de nombreuses souches virulentes et avirulentes appartenant à des types viraux différents, et de déterminer le degré de corrélation entre thermorésistance et virulence. On peut en tout cas prévoir que par culture à température élevée on favorisera la souche virulente du virus du myxome et, par culture à température basse, les souches atténuées. On peut prévoir également que la virulence du virus du fibrome de Shope sera augmentée par culture à température haute. La question d'une corrélation entre virulence et thermorésistance du développement viral est posée ici de nouveau. Est posé également le problème du mécanisme de la sélection des souches atténuées du virus du myxome.

Lorsqu'une souche hautement virulente de myxome est introduite dans un pays, une souche de virulence atténuée fait tôt ou

tard son apparition. Or, il est sinon impossible, tout au moins difficile de se représenter la sélection naturelle d'un mutant atténué si l'on n'admet pas que celui-ci est, à un moment donné, favorisé par les conditions du milieu. Tentons donc d'imaginer un mécanisme. Supposons que les souches atténuées du virus du myxome, comme celles du poliovirus type I, soient moins thermorésistantes que les souches virulentes. Le développement du poliovirus à basse température sélectionne des mutants « froids » sensibles aux températures élevées et de virulence diminuée. S'il en était de même pour le virus du myxome, on comprendrait comment et pourquoi, au cours des saisons froides, des variants « froids » et atténués peuvent prendre le dessus sur le type originel « chaud » et virulent. Il est facile de soumettre cette hypothèse spécifique au test de l'expérience. Il semble bien en tout cas que des recherches sur les caractères du développement viral liés à la virulence pourraient être aujourd'hui utilement entreprises.

★★

Dès 1941, Enders et Pearson [46] découvraient que le virus de la grippe présent dans l'embryon disparaît rapidement après l'éclosion du poussin et incrimaient la température élevée, 40 à 41°, de celui-ci. En 1942, Thompson et Coates [42] écrivaient : « Chez tous les êtres vivants, l'un des facteurs limitants les plus importants pour le développement est la température et, dans la plupart des maladies aiguës, y compris celles causées par les virus, la fièvre est l'un des symptômes prédominants. Il est par conséquent important de déterminer les effets d'une élévation de température sur la croissance et la survie des agents infectieux. » L'hypothèse que la fièvre pouvait jouer un rôle dans l'évolution des infections virales a été exposée à nouveau par nous [30]. Cette hypothèse, les expériences qu'elle a fait naître, les données concernant la virulence et le rôle des facteurs non spécifiques dans l'évolution des maladies virales, les documents relatifs aux corrélations entre la virulence et certaines propriétés du développement viral, un ensemble de faits jusqu'ici épars que les auteurs de traités ont curieusement ignorés et qui n'avaient jamais fait l'objet d'une synthèse, se trouvent aujourd'hui intégrés en un corps de doctrine cohérent. La doctrine comporte, il est vrai, beaucoup d'hypothèses. Son excuse — si toutefois elle en a besoin — est qu'elle projette quelque lumière sur l'obscur problème des interactions organisme-virus et sur celui de la virulence. Son avantage est qu'elle conduit à des hypothèses de travail simples. Nombre d'entre elles sont déjà, dans quelques laboratoires, soumises au test de l'expérience et nous saurons bientôt si la doctrine doit être modifiée, et dans quelle direction.

RÉSUMÉ.

1° Le développement du virus de la poliomyélite, type I, en fonction de la température et du pH a été déterminé au cours d'expériences à cycle unique.

2° D'une souche virale à une autre, la thermosensibilité du développement viral varie dans des proportions considérables. La courbe de thermosensibilité est caractéristique d'une souche donnée.

3° La vitesse de développement des souches thermorésistantes est plus élevée que celle des souches thermosensibles (1).

4° Les températures élevées semblent bloquer une réaction tardive du cycle de développement viral.

5° Par culture à basse température, on peut sélectionner des souches thermosensibles à partir de souches « moyennes », confirmation de résultats de Dubes et Chapin et de Dubes et Wenner.

6° Les souches « froides » isolées par Dubes et Chapin, Dubes et Wenner se sont, entre les mains de ces auteurs, révélées de neurovirulence faible ou nulle. Notre souche « froide » a perdu toute sa neurovirulence originelle (Sabin et Lwoff).

7° Les souches neurovirulentes étudiées jusqu'ici, type I et II, sont thermorésistantes. Les souches de Koprowski et de Sabin (type I) utilisées pour la vaccination par voie orale, dépourvues de neurovirulence, sont thermosensibles.

8° A partir de deux souches, l'une « moyenne », l'autre thermosensible, on a, par passages à températures croissantes, isolé deux variants thermorésistants capables de se développer à 41°. Ceux-ci se sont révélés hautement neurovirulents (Sabin et Lwoff).

9° Au-dessous de pH 6,9 environ, le développement viral est fortement inhibé.

10° Dans une zone inflammatoire, le pH est inférieur à la normale et atteint souvent des valeurs incompatibles avec le développement viral.

11° La fièvre qui accompagne les infections virales est capable d'arrêter le développement des souches thermosensibles et d'inhiber celui des souches thermorésistantes.

12° Une élévation artificielle de la température peut dans certaines conditions assurer la survie d'un animal infecté voué à la mort dans les conditions thermiques normales.

(1) Thermosensibilité et thermorésistance s'appliquent ici uniquement au développement viral et non à l'inactivation thermique des particules infectieuses.

13° Le rôle des facteurs non spécifiques qui gouvernent à la fois le développement viral et l'évolution des infections virales et déterminent le sort de l'animal infecté est discuté.

14° Il existe nécessairement une corrélation entre virulence et résistance élevée du développement viral à des facteurs non spécifiques.

SUMMARY

THE FACTORS OF VIRAL DEVELOPMENT AND THEIR ROLE IN THE EVOLUTION OF INFECTION.

1. The development of poliovirus type I as a function of temperature and pH has been determined.

2. The thermosensitivity of viral development varies from one strain to another to a considerable extent. The thermosensitivity curve is characteristic for a given strain.

3. The rate of development of the thermoresistant strains is higher than that of the thermosensitive ones (2).

4. The high temperatures seem to block one late reaction of the developmental cycle.

5. By passages at low temperatures, thermosensitive strains can be selected from « average » strains, confirmation of results of Dubes and Chapin and of Dubes and Wenner.

6. The neurovirulence of the cold strains isolated by Dubes and Chapin, Dubes and Wenner has been shown by these authors to be low or nil. Our cold strain has lost its original neurovirulence (Sabin and Lwoff).

7. The neurovirulent strains studied so far (type I and II) are thermoresistant. The Koprowski's and Sabin's strains (type I) utilized for oral vaccination and devoid of neurovirulence are thermosensitive.

8. From two strains, one medium, the other thermosensitive, two thermoresistant variants able to develop at 41° have been selected by passages at increasing temperatures. These variants have proved to be highly neurovirulent (Sabin and Lwoff).

9. Below a pH around 6,9, viral development is considerably inhibited.

10. In an inflammatory zone the pH is lower than normal and may reach values which are incompatible with viral development.

(2) Thermoresistance and thermosensitivity apply here only to viral development and not to the thermic inactivation of infectious particles.

11. Fever which accompanies viral infections may stop the development of thermosensitive strains or depress the development of thermoresistant ones.

12. An artificial increase of temperature is sometimes capable of ensuring the survival of an infected animal which otherwise would die.

13. The role of non specific factors which control at the same time viral development and the evolution of viral infections and decide the fate of the infected animal is discussed.

14. A correlation necessarily exists between virulence and a high degree of resistance of viral development to these non specific factors.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ARMSTRONG (C.). *The military Surgeon*, 1942, **91**, 129-145.
- [2] ARVANITAKI (A.) et CHALAZONITIS (N.). *Arch. Sci. Physiol.*, 1951, **5**, 207-226.
- [3] ARVANITAKI (A.) et CHALAZONITIS (N.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 952-954.
- [3 bis] ATKINS (E.) et HUANG (W. C.). *J. exp. Med.*, 1958, **107**, 383-401.
- [4] BODIAN (D.). *Amer. J. Med.*, 1949, **6**, 563-578.
- [5] BODIAN (D.). *Second International Poliomyelitis Conference*, 1952, 402-407, Lippincott Company, édit., Londres.
- [6] BODIAN (D.). *The Harvey Lectures*, 1958 (séries 52, 1956-1957), 23-56.
- [7] BURNET (F. M.). *Med. Res. Council (London) Spec. Rept. Ser.*, 1936, n° 220.
- [8] BURNET (F. M.) et LUSH (D.). *J. Path. Bact.*, 1936, **43**, 105-120.
- [9] COOPER (P. D.). *Virology*, 1955, **1**, 397-401.
- [10] DARNELL (J. E. Jr.). *J. exp. Med.*, 1958, **107**, 633-641.
- [11] DUBES (G. R.) et CHAPIN (M.). *Science*, 1956, **124**, 586-588.
- [12] DUBES (G. R.) et WENNER (H. A.). *Virology*, 1957, **4**, 275-296.
- [13] DULBECCO (R.) et VOGT (M.). *Virology*, 1958, **5**, 220-235.
- [14] DUNNEBACKE (T. H.) et REAUME (M. B.). *Virology*, 1958, **6**, 8-13.
- [15] EAGLE (H.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1955, **89**, 362-364.
- [16] ENDERS (J. F.) et PEARSON (H. E.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1941, **48**, 143-146.
- [17] FISCHER (T. N.) et GINSBERG (H. S.). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1957, **95**, 47-51.
- [18] FRUNDER (H.). *Die Wasserstoffionenkonzentration im Gewebe lebender Tiere nach Messungen mit der Glasselektrode*, Fischer, édit., Iena 1951.
- [19] FRUNDER (H.). *The mechanism of inflammation. An International Symposium*, G. Jasmin et A. Robert, édit., Acta Inc., Montréal, 1953.
- [20] GROMAN (N.), LWOFF (A.) et LWOFF (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960 (à l'impression).
- [21] HO (M.) et ENDERS (J. F.). *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1959, **45**, 385-389.
- [22] HOWES (D. W.) et MELNICK (J. L.). *Virology*, 1957, **4**, 97-108.

- [23] HSIUNG (G. D.) et MELNICK (J. L.). *J. Immunol.*, 1958, **80**, 282-293.
 - [24] HURST (E. W.). *J. Path. Bact.*, 1929, **32**, 457-477.
 - [25] ISAACS (A.) et LINDENMANN (J.). *Proc. roy. Soc., B*, 1957, **147**, 258-267.
 - [26] KASSANIS (B.). *Adv. Virus. Res.*, 1957, **4**, 221-241.
 - [27] KILHAM (L.). In *Perspectives in Virology*, Wiley and Sons, édit., New York, 1959.
 - [28] LEVY (H. B.) et BARON (S.). *J. inf. Dis.*, 1957, **100**, 109-118.
 - [29] LWOFF (A.). *Bact. Rev.*, 1959, **23**, 109-124.
 - [30] LWOFF (A.) et LWOFF (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1958, **246**, 190-192.
 - [31] LWOFF (A.) et LWOFF (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **248**, 154-156.
 - [32] LWOFF (A.) et LWOFF (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **248**, 1725-1727.
 - [33] LWOFF (A.), TOURNIER (P.) et CARTEAUD (J. P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **248**, 1876-1878.
 - [34] MARSHALL (I. D.). *J. Hyg.*, 1959, **57**, 484-497.
 - [35] PARKER (R. F.) et THOMPSON (R. L.). *J. exp. Med.*, 1942, **75**, 567-573.
 - [36] SABIN (A. B.). *Spec. Publ. N. Y. Acad. Sci.*, 1957, **5**, 115-126.
 - [37] SABIN (A. B.) et LWOFF (A.). *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1959, **45**.
 - [38] SABIN (A. B.), WINSSER (J.) et HENNESSEN (W. A.). *Atti Congres. intern. Microb.*, Rome, 1953, **3**, section 8, 156-159.
 - [39] SIGURDSSON (B.). *J. exp. Med.*, 1943, **78**, 17-26.
 - [40] THOMAS (L.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1953, **56**, 623-814.
 - [41] THOMPSON (R. L.). *J. inf. Dis.*, 1938, **62**, 307-312.
 - [42] THOMPSON (R. L.) et COATES (M. S.). *J. inf. Dis.*, 1942, **71**, 83-85.
 - [43] VOGT (M.), DULBECCO (R.) et WENNER (H. A.). *Virology*, 1957, **4**, 141-155.
 - [44] WALKER (D. L.) et BORING (W. D.). *J. Immunol.*, 1958, **80**, 39-44.
-

LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT AU COURS ET AU DÉCOURS DES INFECTIONS A ADÉNOVIRUS

par R. SOHIER, Y. CHARDONNET et J. FREYDIER (*).

(Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon)

La lecture des nombreuses publications parues à ce jour sur les adénovirus, et en particulier celles relatives à l'identification, par des méthodes biologiques, des affections qu'ils provoquent, fait apparaître certaines interprétations qui risquent de conduire à de regrettables erreurs diagnostiques et épidémiologiques.

Il nous a donc paru utile d'attirer l'attention sur la valeur et les limites de la méthode de fixation du complément, du moins lorsqu'elle est mise en œuvre sur un seul sérum prélevé au décours d'une affection dans le déterminisme de laquelle peut intervenir un adénovirus.

On sait qu'il est souvent difficile d'obtenir qu'un prélèvement de sang soit effectué dès le début de la maladie et suivi d'un autre, séparé du premier par un intervalle d'au moins huit jours. Or, la comparaison des résultats obtenus permet d'apprécier l'apparition des anticorps fixant le complément ou, tout au moins lorsque le premier prélèvement a été effectué avec un long retard, l'augmentation significative du titre de ces anticorps, ce qui donne à la méthode toute sa valeur.

Le plus souvent, le laboratoire reçoit un seul sérum prélevé au plus tôt huit jours après le début de la maladie, ou deux sérums obtenus très diversement et à des intervalles variables. Il pouvait donc être utile de rechercher comment évoluent les anticorps, ce qui nous a conduits à mettre en œuvre la réaction de fixation du complément sur des sérums prélevés au début, puis au cours et au décours d'infections dues à des adénovirus.

MATÉRIEL.

Les 180 sérums qui ont été utilisés pour cette enquête avaient essentiellement trois origines. Un premier lot de 95 sérums a été recueilli chez 32 malades au cours d'une épidémie d'infections à adénovirus du

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 juillet 1959.

type 7-a, survenue dans une collectivité militaire et qui a fait l'objet d'une étude complète précédemment publiée [4]. Un deuxième lot était constitué par 57 sérums prélevés chez 26 nourrissons et enfants hospitalisés dans deux services de pédiatrie de Lyon (professeur Bernheim et professeur Jeune) et d'un service d'enfants de Montpellier (professeur Chaptal). Le troisième comportait 28 sérums recueillis dans diverses formations hospitalières chez 12 adolescents ou adultes.

Ces sérums étaient utilisés en général dès leur arrivée dans notre laboratoire, mais une partie était congelée et conservée à -25° pour des études ultérieures.

Des fiches d'observation demandées aux médecins permettaient de connaître d'une part les symptômes cliniques observés, et d'autre part la date du début de la maladie, c'est-à-dire le nombre de jours écoulés lors du prélèvement du sérum.

Nous n'avons retenu que les sérums provenant de sujets atteints d'une maladie dont on avait des raisons de penser, compte tenu des anamnestiques, de l'épidémiologie et des signes cliniques, qu'elle pouvait être provoquée par un virus. En outre, nous exigeons pour le diagnostic sérologique soit une augmentation significative du titre des anticorps (quatre fois le titre initial trouvé) si deux sérums ou plus avaient été prélevés, soit un titre minimum de 64 si nous n'avions pu obtenir qu'un premier prélèvement tardif et d'autres au décours de la maladie.

MÉTHODE.

Nous avons employé pour l'isolement du virus une technique précédemment décrite [4] et pour la réaction de fixation du complément une micro-méthode en tubes, dont le protocole détaillé a fait l'objet d'une publication [2].

L'antigène utilisé a été préparé sur cellules HeLa cultivées dans le milieu de croissance suivant : lactalbumine (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio) 0,5 p. 100, Yeastolate (Difco) 0,1 p. 100 dans solution de Earle additionnée de 10 p. 100 de sérum de poulain. Les cellules cultivées en boîtes de Kolle ensemencées avec quatre à cinq millions de cellules, étaient inoculées lorsqu'elles étaient âgées de 4 jours, alors que la surface était couverte à 80 ou 90 p. 100. Le milieu de survie était le même que le milieu de croissance, sauf pour le sérum de poulain remplacé par 20 p. 100 de liquide amniotique de bovidés. L'inoculat était constitué par 0,5 à 1 ml de suspension d'adénovirus type 1 dilué dans 30 ml de milieu de survie. La dégénérescence des cellules était totale entre le quatrième et le cinquième jour.

On procédait à un broyage des éléments cellulaires désintégrés dans le broyeur de Durel-Sausse (deux minutes à 18 000 tours). Centrifugation dans la centrifugeuse réfrigérée Sorvall SS I, trente minutes à 10 000 tours. Le surnageant constituait l'antigène conservé à -20° . Le titrage par la méthode de Boerner-Luckens donnait un titre de 16. Deux unités antigéniques (dilution au 1/8) étaient engagées dans la réaction de fixation du complément.

RÉSULTATS.

Ils ont été résumés dans la figure 1, en tenant compte d'une part du titre des anticorps, d'autre part du nombre de jours séparant le début de la maladie du prélèvement de sérum.

On constatera tout d'abord que des titres élevés d'anticorps sont décelés aussi bien chez les nourrissons et les enfants que chez les adultes, et pour ceux-ci aussi bien au cours d'une infection épidémique du type 7-a qu'après une atteinte par d'autres types antigéniques.

Par ailleurs, on note que les anticorps sont absents pendant les premiers jours de la maladie ou existent apparemment à des titres très faibles, puisque 23 sérums sur 39 n'en contiennent pas et que, pour 9, le titre est inférieur ou égal à 8 ; les 7 autres ont un titre égal ou inférieur à 32. Encore convient-il de faire quelques réserves à ce sujet, compte tenu des erreurs possibles concernant le début exact de l'infection. Il est d'ailleurs parfois difficile à préciser tant par le patient que par le médecin, surtout lorsque les premières manifestations morbides apparaissent progressivement. Jusqu'au cinquième jour inclus, il n'y a pas de titres atteignant 64. Par contre, on trouve des titres égaux ou supérieurs à 64 dans 18 sérums sur 36 du sixième au dixième jour, et dans 28 sérums sur 34 du onzième au quinzième jour (fig. 1).

On pourrait donc admettre que, pour établir un diagnostic sérologique d'infections à adénovirus chez un sujet ayant présenté un état infectieux accompagné des symptômes habituellement observés au cours de ces infections (affection broncho-pulmonaire aiguë, état infectieux à forme grippale avec ou sans manifestations broncho-pulmonaires, adéno-pharyngo-conjonctivite, ou seulement pharyngite avec adénite, ou pharyngo-conjonctivite sans adénopathie, etc.), il faut, si l'on ne dispose que d'un seul sérum prélevé entre le sixième et le trentième jour après le début de la maladie, exiger un titre d'anticorps fixant le complément de 64 au minimum, le titre de 32 n'ayant qu'une valeur présomptive.

Certes, la constatation d'un titre plus bas n'élimine pas le diagnostic d'infection à adénovirus, mais, en l'absence de la notion d'apparition des anticorps à un titre suffisant ou de leur augmentation nette (appréciable seulement par étude de deux prélèvements effectués dans des délais convenables), elle ne peut intervenir qu'avec les plus expresses réserves. Par contre le titre de 32, par exemple, pourra prendre une valeur si l'on a pu mettre en œuvre la réaction sur deux sérums, dont le premier prélevé avant le cinquième jour aura révélé un titre inférieur ou égal à 8.

De même qu'il a été possible de définir les titres significatifs d'infections récentes pour certaines infections respiratoires

[illegible]

FIG. 1.

telles que la grippe, l'ornithose, et pour d'autres comme les oreillons, on pourrait avancer celui de 64 comme pouvant traduire l'évolution d'une infection à adénovirus dans les jours ou semaines précédents. Mais, comme pour les infections virales précitées, ce titre ne prend sa valeur que dans la mesure où l'on connaît l'évolution des anticorps au cours des semaines et des mois écoulés après la guérison. C'est ce devenir des anticorps que nous avons tenté d'apprécier.

Certes, il n'a pas toujours été facile de faire faire les prélèvements que nous aurions souhaité obtenir ; du moins, nous sommes-nous efforcés d'en recueillir le plus grand nombre possible.

Les résultats de la figure 1 ont été disposés dans le tableau I en fonction des délais écoulés depuis le début de la maladie, délais groupés par période et en notant pour chaque titre le nombre de sérums pour lesquels il a été atteint (tableau I).

TABLEAU I.

TITRE DES ANTI - CORPS	DELAI ENTRE LE DEBUT DE LA MALADIE ET LE PRELEVEMENT										TOTAL DES PRELEVE- MENTS
	I à 5	6 à 10	11 à 15	16 à 20	21 à 30	II	III	IV à V	VI à VIII	IX à XII	
	(en jours)					(en mois)					
1024			I		I						2
512		I	2		I	I					5
256		2	4	2	3	I		2			14
128		9	7	2	I	2					21
64		6	15	5	6	6	I				39
32	4	6	5	2	I	7	I	I	I	I	29
16	3	5	I	I	I	3	I	5			20
8	6	3				I	2	3	I		16
4	3	2									5
0	23	2						3	I		29
	39	36	35	12	14	21	5	14	3	I	= 180

Il ressort de ce tableau que les titres d'anticorps demeurent élevés pendant les deux premiers mois, puisque du seizième jour au soixantième, on décèle encore des titres supérieurs ou égaux à 64 dans 31 sérums sur 47. En outre, on notera que pour un certain nombre de malades, ils disparaissent très lentement. On relève, en effet, entre le troisième et le huitième mois, les titres de 256 deux fois, de 64 une fois, de 32 trois fois et de 16 six fois. Enfin, au douzième mois, un malade avait encore un titre de 32 ; il s'agit du malade B... dont l'observation a été publiée antérieurement [3] et chez lequel l'évolution des anticorps a pu être étudiée d'après sept prélèvements effectués en douze mois.

RÉSUMÉ.

La réaction de fixation du complément a été effectuée sur 180 sérums provenant de 70 sujets pouvant être considérés, d'après des signes cliniques et biologiques et dans certains cas épidémiologiques, comme atteints d'infection à adénovirus.

Le but de cette étude était de préciser, en fonction des modalités d'évolution des anticorps, d'une part les titres pouvant être considérés comme significatifs d'une infection récente, et d'autre part les délais dans lesquels les anticorps disparaissaient.

Des résultats obtenus, il ressort essentiellement que lorsqu'on ne dispose que d'un seul sérum recueilli entre le sixième et le trentième jour, on peut admettre qu'un titre supérieur ou égal à 64 traduit une infection récente tandis que le titre de 32 n'a qu'une valeur de présomption.

Les anticorps persistent parfois longtemps après la maladie et leur titre peut être encore élevé entre le troisième et le huitième mois (256 deux fois, 64 une fois, 32 trois fois) et non négligeable un an après (32 une fois). On devra en tenir compte dans tous les cas où l'on aura à établir un diagnostic ou à recueillir des informations épidémiologiques, et où il n'aura pas été possible d'apprécier l'évolution de la réaction de fixation du complément en l'effectuant sur deux sérums prélevés à des intervalles convenables.

SUMMARY

THE COMPLEMENT-FIXATION REACTION IN THE COURSE OF THE DISEASE AND DURING CONVALESCENCE IN ADENOVIRUS INFECTIONS.

This reaction has been carried out on 180 sera from 70 individuals presenting clinical, biological and epidemiological symptoms of adenovirus infection.

When one sample only of serum taken between the sixth and the thirtieth day is available, a titer higher or equal to 64 may prove

a recent infection, whereas a titer of 32 has but a presumptive value.

The antibodies may persist a long time after the disease and their titer may still be high between the third and the eighth month (256 twice, 64 once, 32 three times), and non negligible after one year (32 once). This fact must be kept in mind when a diagnostic must be established, or in case of an epidemiological inquiry, when it has not been possible to follow the evolution of the complement fixation reaction by examination of two sera taken at convenient intervals.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SOHIER (R.), BENSIMON (P.), CHARDONNET (Y.), CHALLUT (F.) et FREYDIER (J.). *Rev. Hyg.*, 1957, **5**, 423.
 - [2] SOHIER (R.), PEILLARD (M. M.), GINESTE (J.) et FREYDIER (J.). *Ann. clin.*, 1956, **14**, 281.
 - [3] SOHIER (R.), BENSIMON (P.) et LAGABRIELLE (B.). *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1957, **73**, 37.
-

ÉTUDE DES VIRUS ENTÉRIQUES DE L'HOMME

ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET RECHERCHES SÉROLOGIQUES EN 1958

par J. MAURIN, M^{mes} M.-C. CARRÉ et J. VIRAT (*).

(Institut Pasteur, Service des Virus [D^r P. LÉPINE])

Le diagnostic de laboratoire des virus entériques prend de plus en plus d'importance dans le cadre global du diagnostic des maladies à virus. Ce diagnostic repose sur deux éléments : l'isolement du virus et les recherches sérologiques. Parmi celles-ci, nous n'envisagerons ici que la fixation du complément, les épreuves de neutralisation, qui sont d'un intérêt majeur pour les recherches sur l'immunité naturelle ou acquise, n'entrant pas dans le cadre de ce travail.

I. — ISOLEMENT.

Dans le Service des Virus, l'isolement des virus entériques a déjà fait l'objet de plusieurs communications [1, 2, 3, 4]. Nous rapportons ici les résultats concernant l'année 1958 pour le virus poliomyélitique, et les deux dernières années pour les autres entérovirus.

La technique est la même que celle de l'année précédente [4], en particulier pour l'inoculation des cellules avec l'extrait de matières fécales ou le liquide de prélèvement (premier passage) ; nos recherches sur la sensibilité des différentes méthodes étant encore en cours, nous n'avons pas apporté de modifications au procédé utilisé en 1957.

Les résultats des isollements effectués en 1958 figurent dans le tableau I.

Sur 1711 examens pratiqués, nous avons obtenu 294 résultats positifs, ce qui correspond à un pourcentage général de positivité de 17,2 p. 100. Ce pourcentage peut paraître faible, mais il s'explique du fait que nous acceptons toujours de tenter l'isolement, quelles que soient les conditions dans lesquelles les prélèvements ont été effectués. Certains d'entre eux, en effet, sont

(*) Société Française de Micrologie, séance du 1^{er} octobre 1959.

très tardifs et les chances d'y trouver du virus sont des plus réduites.

Ces 1711 examens correspondent à 1490 malades, car pour certains de ceux-ci nous avons eu deux prélèvements, quelquefois davantage. Chez 272 malades on a trouvé au moins 1 résultat positif (18,3 p. 100).

TABLEAU I. — Résultats généraux.

Nombre d'exams pratiqués	Nombre correspondant de malades	Résultats négatifs	Résultats positifs			
			Polio I	Polio II	Polio III	Entérovirus non polio
1711	1490	1417	159	15	64	56

Suivant la nature du prélèvement on peut encore distinguer plusieurs catégories. La plus importante correspond naturellement aux selles : 1516 prélèvements dont 270 positifs (17,8 p. 100). L'ensemble correspond à 1447 malades parmi lesquels 263 ont eu au moins un résultat positif. Dans 65 cas nous avons reçu deux prélèvements successifs du même malade. Les deux prélèvements ont été trouvés positifs dans 7 cas, dans 9 cas le premier seulement, dans 6 cas le deuxième seulement. Pour les 43 cas restants les deux sont restés négatifs, mais trois fois on a isolé un entérovirus à partir de la gorge du malade. Dans 2 cas, nous avons reçu trois prélèvements de selles successifs : résultats négatifs.

TABLEAU II. — Les prélèvements.

Nature ou origine du prélèvement	Nombre de prélèvements examinés	Positifs
LCR	101	0
Pharynx	64	21
Sang	12	3
Ganglion	5	0
Cerveau	3	0
Liquide péricardique	3	0
Polype	2	0
Placenta (et oeuf)	2	0
Myocarde	1	0
Foie	1	0
Prélèvement oculaire	1	0

Les autres catégories sont constituées par des prélèvements divers qui nous ont été envoyés par les hôpitaux ou les médecins de ville. La liste en figure sur le tableau II.

Il ne saurait évidemment être question de calculer des pourcentages sur des nombres aussi faibles.

Les 101 prélèvements de liquide céphalo-rachidien correspondent à 98 malades ; ils sont tous négatifs, bien que dans 12 cas on ait pu isoler simultanément un virus entérique, soit des selles (onze fois), soit de la gorge (une fois).

TABLEAU III. — Epidémie de crèche.

N° du Cas	Prélèvement de gorge		Prélèvement de selles	
7077	-	-	-	-
7078	-	-	-	-
7079	+	-	-	-
7080	-	-	-	-
7081	-	-	-	-
7082	-	-	+	-
7083	+	-	-	-
7084	+	-	+	+
7085	+	+	+	
7086	-	+	-	+
7087	+	+	-	+
7088	+		+	
7089	-	+	-	+
7090	-	-	-	-
7091	-	-	-	+
7092	+	-	+	+
7093	+		+	
7094	-	-	-	-
7095	+	-	+	+
7096	+	-	+	-
7097	-		-	
7098	+	-	+	-

Les 64 prélèvements pharyngés correspondent à 44 malades ; 19 d'entre eux ont eu au moins 1 résultat positif ; chez ces individus le virus a été retrouvé dans les selles, sauf dans 5 cas. Parmi les 25 négatifs restants, 3 seulement avaient un entérovirus dans les selles. La fréquence des isollements à partir de la gorge est donc relativement élevée, surtout lorsque le prélèvement est précoce. Ce fait est particulièrement net dans le cas d'une

petite épidémie de poliomyélite à virus type III survenue dans une crèche parisienne. Un cas de poliomyélite paralytique s'y étant déclaré, l'enfant atteint a été hospitalisé et des prélèvements systématiques effectués sur tous les autres enfants. Un seul d'entre eux a présenté des manifestations cliniques, sous la forme d'un syndrome méningé avec parésie. Il s'agissait au total de 22 enfants qui ont subi pour la plupart 2 prélèvements de selles et 2 de gorge, les deuxièmes prélèvements étant effectués 19 jours après les premiers. Le tableau III résume les résultats obtenus. *On remarquera la proportion élevée de résultats positifs* : 15 enfants sur 22 (plus des deux tiers) en ont au moins un.

Au total nous avons trouvé le virus 15 fois dans la gorge et 16 fois dans les selles. Il semble en outre que le virus disparaisse plus vite du pharynx que de l'intestin, ce qui confirme l'observation d'autres auteurs, en particulier Zourbas et M^{me} Drouhet [5], qui par ailleurs ont eu une proportion de résultats positifs encore plus élevée.

Dans les 12 prélèvements de sang, on relève 3 résultats positifs. Il ne s'agit pas ici de virus poliomyélitique mais de virus Coxsackie comme nous le verrons plus loin ; les selles correspondantes sont restées négatives.

Tous les autres prélèvements sont demeurés négatifs.

ETUDE PARTICULIÈRE DES VIRUS POLIOMYELITIQUES. — Tenant compte du fait que plusieurs prélèvements ont pu être positifs chez le même malade, le nombre de souches isolées chez des individus différents s'est élevé en 1958 à 217, contre 350 l'année précédente, où cependant le nombre d'examenés pratiqués avait été moindre. Ce fait est en relation avec la diminution de la morbidité poliomyélitique en 1958 par rapport à 1957. Parallèlement à cette diminution dans le nombre des souches isolées, nous pouvons constater une modification dans la répartition des types. Comme il apparaît dans le tableau IV, le type I, tout en restant le plus fréquent, ne représente plus que 71,4 p. 100 au lieu de près de 90 p. 100, et le type III, au contraire, voit son pourcen-

TABLEAU IV. — Répartition des types de virus poliomyélitique.

	Type I	Type II	Type III	Total
Nombre de souches isolées	155	14	48	217
Pourcentage	71,4 %	6,5 %	22,1 %	100 %

tage monter de 4,3 p. 100 à 22,1 p. 100. La proportion de type II reste pratiquement inchangée.

La répartition suivant le syndrome clinique est mise en évidence dans le tableau V, les catégories étant les mêmes que dans notre publication concernant l'année 1957 [4].

TABLEAU V. — **Virus poliomyélitique : Répartition suivant le syndrome clinique.**

	Type I	Type II	Type III	Total	Pourcentage total
Syndromes paralytiques	92	7	13	112	51,6
" méningés	34	2	10	46	21,2
" méningo- encéphalitiques	6	1	1	8	3,7
" fébriles	12	2	8	22	10,1
Contacts	2	2	4	8	8,3
(sans renseignements)	9	0	2	11	5,1

On voit que le pourcentage de formes paralytiques ou paré-
tiques n'est pas très différent : 51,6 p. 100 en 1958 contre
53,4 p. 100 en 1957, malgré la répartition différente des types ;
de même pour les formes méningées pures (21,2 p. 100 contre
20,0 p. 100).

DÉTERMINATION DE SOUCHES. — Outre les prélèvements pour
isolement, dans l'année 1958 nous avons reçu 62 souches de virus
entériques aux fins de détermination. Les origines de ces souches
étaient très diverses : l'Indochine (34 souches), la Suisse
(8 souches) et différentes villes de France (20 souches).

La répartition des types était la suivante :

a) *Souches d'Extrême-Orient* : type I : 9 ; type II : 5 ; type III :
16 ; entérovirus non poliomyélitiques : 4.

b) *Souches européennes* : type I : 15 ; type II : 4 ; type III : 3 ;
entérovirus non poliomyélitiques : 6.

On notera les différences significatives même sur des nombres
peu élevés.

ETUDE DES ENTÉROVIRUS NON POLIOMYÉLITIQUES. — Lorsque le
typage au moyen des trois sérums antipoliomyélitiques spéci-
fiques I, II et III est demeuré négatif, il est possible d'éliminer
par neutralisation au moyen d'un sérum polyvalent l'éventualité
d'un mélange de deux souches de virus poliomyélitique de type

différent. Nous en avons observé 1 cas (type I + type II). De toutes façons on inocule systématiquement des tubes à lamelles afin d'observer les lésions cellulaires colorées : ceci pour éliminer les virus n'entrant pas dans le groupe des entérovirus, lesquels, comme on le sait, ont tous le même effet cytopathogène. Ainsi, en 1958, ont été isolées 3 souches d'adénovirus que nous ne faisons pas entrer dans notre statistique.

Au cours de la détermination des entérovirus non poliomyélitiques, la première étape consiste à reconnaître les virus Cocksackie. Pour cela on a recours, d'une part à l'inoculation de souriceaux de 24 heures et d'autre part au typage avec des sérums anti du groupe B (B_1 à B_6) et A_9 . On sait en effet que seuls les virus Cocksackie de cette catégorie sont cytopathogènes en culture de tissus.

Il faut dire que l'inoculation aux souriceaux n'est pas un procédé absolument fidèle ; on risque de méconnaître des souches de Cocksackie en ne considérant comme telles que celles qui ont donné au moins deux passages positifs sur les souriceaux. Dans 5 cas, en effet, nous avons isolé une souche de Cocksackie, alors que l'inoculation préalable aux souriceaux de moins de 24 heures avait donné pour résultats :

- a) Quatre fois entièrement négatif au deuxième passage ;
- b) Une fois un seul souriceau sur 5 mort au premier passage.

Dans la mesure du possible, nous essayons donc de faire parallèlement l'épreuve sur les souriceaux et le typage en culture de cellules.

S'il ne s'agit pas d'un virus Cocksackie, c'est alors que l'on a affaire à un virus du groupe ECHO. La détermination du type par la séro-neutralisation, étant donné le nombre élevé de types antigéniques, est beaucoup trop longue pour pouvoir entrer dans le travail de routine.

Voici les résultats obtenus pour les années 1957 et 1958. Sur 85 entérovirus non poliomyélitiques isolés, 22 étaient des virus Cocksackie, 6 des virus ECHO, 57 n'ont pas été identifiés. Parmi ces derniers, 43 n'étaient pas pathogènes pour les souriceaux nouveau-nés : ce sont donc vraisemblablement des ECHO mais le typage n'a pas été pratiqué. Sur les 14 souches restantes, 8 ont provoqué chez le souriceau, à différents passages, une mortalité et une morbidité variables, rappelant plus ou moins cliniquement et histologiquement les aspects de l'infection à Cocksackie B. Pour ces 8 souches les essais de typage effectués dans les mêmes conditions que pour les autres sont demeurés sans résultat. Cependant, dans 2 cas les lésions histologiques se sont avérées caractéristiques, avec infiltration des faisceaux musculaires, foyers de nécrose de la graisse interscapulaire et du myocarde, dégénérescence massive du cortex cérébral et des cornes d'Ammon.

Peut-être y a-t-il là une association de virus. Les recherches seront poursuivies dans ce sens.

La répartition suivant le syndrome et suivant le type est indiquée dans les tableaux VI et VII.

TABLEAU VI. — Entérovirus non poliomyélitiques : Répartition suivant le syndrome clinique.

Syndromes	Total	Coxsackie	Pourcentage Coxsackie
Respiratoires	19	4	
Méningés	37	11	
Paralytiques ou parétiques	10	2	
Neurologiques divers	4		
Cardio-vasculaires	3	1	
Diarrhéique	1		
Fébriles	6	3	
Malformations multiples	1	1	
(sans renseignements)	4		
Total	85	22	25,9 %

TABLEAU VII. — Entérovirus non poliomyélitiques : Répartition suivant le type.

Total Cox.	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	ECHOS	Souches non typées
22	2	2	11	3	4	1 type 1 1 type 9 4 types 14	57

On remarquera le nombre élevé de souches de type B₃. Parmi celles-ci, 3 proviennent d'échantillons de sang prélevés chez des enfants au cours d'une épidémie de méningite ; les extraits de matières fécales correspondants étaient négatifs.

En ce qui concerne les 62 souches de virus entériques mentionnées plus haut, provenant d'Indochine ou d'Europe, 2 de ces dernières appartenaient au groupe Coxsackie ; une au type B₂ et une au type B₃.

II. — SÉROLOGIE.

Si l'isolement de virus à partir des selles du malade constitue un moyen diagnostique suffisant, en revanche il présente l'inconvénient d'exiger un délai relativement long avant que la réponse puisse être rendue. Il est souvent utile de pouvoir déterminer plus tôt l'étiologie de l'affection ; c'est pourquoi la réaction de fixation du complément nous paraît devoir être une épreuve intéressante, parce que facile à exécuter et permettant un diagnostic plus précoce [6, 7]. Nous décrirons rapidement la méthode employée et les résultats obtenus dans le courant de l'année 1958. Notre but essentiel a été, pendant cette année, de simplifier la préparation des antigènes en augmentant le pouvoir antigénique. Après différents essais, nous nous sommes arrêtés à une technique qui nous donne un antigène titrant 4 à 8 unités. Nous donnons ci-dessous la description de cette technique (1) bien que nous la considérons comme provisoire, car nous envisageons actuellement l'utilisation d'antigènes concentrés par précipitation.

Nous ferons enfin une brève revue des premiers résultats de 1959, résultats beaucoup plus intéressants que ceux de 1958, ce qui nous permet de penser que nous avons déjà fait un pas dans l'amélioration des antigènes.

ANTIGÈNES. — Après avoir employé comme antigènes, à titre expérimental, des suspensions de virus concentrées 80 fois par ultracentrifugation, et qui nous avaient donné des résultats satisfaisants avec un nombre limité de sérums de malades, nous avons dû, afin d'obtenir des antigènes en quantité plus importante, nous arrêter à la technique suivante :

L'antigène est préparé sur cellules de souche KB. Il est nécessaire de préparer 3 antigènes : un pour chaque type sérologique de virus. Les souches de virus que nous utilisons sont les souches classiques américaines : Mahoney pour le type I, MEF1 pour le type II et Saukett pour le type III. Pour chaque souche de virus, on prépare 3 boîtes de Roux de cellules de souche KB. Ces cellules sont cultivées dans du milieu à l'hydrolysate de caséine suivant la formule du Service des Virus [8], additionné de 10 à 15 p. 100 de sérum de poulain ou de veau. Lorsque la croissance cellulaire est à son maximum (les cellules tendant à se décoller sur les bords), on peut procéder à l'inoculation de la première boîte. On remplace le milieu de croissance par un autre milieu moins riche en sérum. Nous avons ainsi utilisé successivement du milieu à l'hydrolysate de caséine avec 2,5 p. 100 de sérum de poulain, puis toujours l'hydrolysate de caséine mais avec 20 p. 100 de bouillon « tryptose phosphate » Difco à 29,5 p. 1 000 ; dans tous les cas le volume de milieu pour une boîte de Roux est réduit de 100 à 25 ml. La première boîte est

(1) Nous tenons à remercier M. A. Betz et M^{lle} G. Ceolin pour l'aide qu'ils nous ont apportée dans la mise au point de cette technique.

inoculée en introduisant 2 ml d'une suspension de virus de titre élevé et la destruction totale est obtenue en 24 heures à 37°. A ce moment le liquide est prélevé, centrifugé pendant 20 minutes à 3 000 t/mn, puis introduit dans la deuxième boîte de Roux préalablement vidée de son milieu. Après 24 heures d'étuve, la même manœuvre est répétée pour la troisième boîte. Celle-ci sera laissée à l'étuve pendant 10 jours, après quoi le liquide sera centrifugé, constituant ainsi l'antigène. La même préparation étant donc faite parallèlement pour chacune des 3 souches de virus, les antigènes sont chauffés pendant 5 heures à 60° avant l'emploi afin d'atténuer leur pouvoir pathogène et de détruire leur pouvoir anticomplémentaire.

SÉRUMS. — Les sérums de référence sont des sérums humains de malades chez lesquels un virus poliomyélitique a été isolé et dont le titre est au moins égal à 1/64.

HÉMATIES. — Hématies de mouton conservées à + 4° sur liquide d'Alsever, lavées trois fois et mises en suspension dans le diluant employé habituellement au laboratoire [9].

SÉRUM HÉMOLYTIQUE. — Sérum de lapin titrant 3 unités hémolytiques à 1/4 000.

COMPLÉMENT. — Sérum de cobaye conservé congelé à la température de — 70°.

La réaction se fait en tubes à raison de 0,1 ml d'antigène et de sérum à titrer dilué de 1/4 à 1/128, 0,2 ml d'une dilution de complément à 1,5 unité et 0,2 ml d'hématies à 2 p. 100 sensibilisées. La fixation se fait la nuit à + 4°.

RÉSULTATS. — En 1958, nous avons fait 142 réactions de fixation du complément avec des antigènes poliomyélitiques de type I, II et III. Sur ces 142 réactions, 59 ont été positives qui se répartissent selon les syndromes cliniques suivants :

- 31 affections parétiques ou paralytiques,
- 17 syndromes méningés ou méningo-encéphalitiques,
 - 1 syndrome d'ataxie cérébelleuse aiguë,
 - 2 syndromes infectieux avec asthénie et pharyngite banale,
- 3 enfants ayant fait une pharyngite vésiculeuse ; ce cas particulier sera d'ailleurs étudié plus loin,
- 4 prélèvements non accompagnés de renseignements mais provenant d'une épidémie de poliomyélite en Afrique,
- 1 affection avec troubles coronariens.

L'isolement d'un virus à partir des selles a été tenté chez 30 des malades ayant une réaction sérologique positive. Le virus a été retrouvé chez 17 d'entre eux. Ces chiffres sont évidemment faibles, mais sur les 13 isolements négatifs, 5 au moins ont été faits dans

de mauvaises conditions (prélèvements de selles trop tardifs), et pour 4 autres les dates de prélèvements ne nous avaient pas été communiquées. En ne tenant compte que des résultats bruts, la réaction de fixation du complément n'a eu de valeur que dans 56 p. 100 des cas. En fait, ces résultats portent sur un nombre de cas trop peu élevé pour être vraiment significatifs.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS SÉROLOGIQUES.

1° La réaction de fixation du complément a-t-elle une valeur spécifique pour la détermination du type de virus en cause ? Un certain nombre d'auteurs (Svedmyr [7], Black et Melnick [40], Schmidt et Lennette [41] entre autres) estiment que l'antigène non chauffé permet d'obtenir des résultats homologues.

Etant donné les dangers de manipulation d'une part, et le pouvoir anticomplémentaire de nos antigènes avant chauffage d'autre part, nous ne travaillons qu'avec des antigènes chauffés comme nous l'avons déjà indiqué. Il ne nous est donc pas possible de savoir si nous obtiendrions des résultats différents avec des antigènes non chauffés. En fait, les résultats que nous avons acquis sont assez variables sur ce point. Pour 12 isoléments de virus de type I, on trouve 10 sérums ayant les 3 types d'anticorps, 1 sérum avec les types I et II et 2 avec les seuls anticorps homologues. Pour 2 isoléments de virus de type III, nous avons une réaction positive avec l'antigène homologue seulement, et une réaction positive avec les 3 types d'antigène. Pour 1 isolement de virus de type II, nous retrouvons une réaction purement homologue.

2° Nous obtenons des titres d'anticorps variables. Les sérums ont la plupart du temps un titre relativement bas : 1/4, 1/8 ou 1/16 ; on trouve encore assez fréquemment des sérums fixant le complément à 1/32, plus rarement à 1/64 ou 1/128. Comme, d'autre part, presque tous les sérums sur lesquels a été faite cette étude sont des exemplaires uniques, nous sommes obligés, pour établir la positivité de la réaction, de tenir compte davantage de la présence des anticorps que de leur titre. Nous avons donc peu de moyens de constater l'évolution des anticorps chez les malades. Souvent aussi la date de début de la maladie n'a pas été mentionnée dans les renseignements qui nous ont été communiqués. Si l'on se réfère à la date d'apparition des paralysies ou même des signes méningés, on peut dire que l'apparition des anticorps fixant le complément est précoce. Donc, même dans les cas où l'on reçoit 2 échantillons de sérum, il est difficile de mettre en évidence une augmentation nette. C'est ainsi que sur les 5 paires de sérums dont nous avons pu disposer, une seule a révélé une augmentation de titre de 1/8 à 1/16 (sérums prélevés 5 et 17 jours

après le début de la maladie). Chez un autre malade, les anticorps sont restés en plateau (sérum prélevé après 7 et 20 jours). Chez les autres enfin on a observé :

10 jours	1/16
1 mois	< 1/8
1 jour	≥ 1/32
13 jours	1/16
6 jours	1/16
36 jours	1/8

Il est bien entendu que ces résultats correspondent à des titrages faits dans une même épreuve.

Les anticorps fixant le complément semblent donc diminuer rapidement. Ce fait, joint à leur apparition précoce, amène à penser que l'idéal serait de pouvoir disposer de 3 sérums : l'un prélevé avant l'apparition des paralysies, à la phase angineuse par exemple, le deuxième à la période d'état, et le troisième au cours de la convalescence. Ainsi serait-il possible d'observer une montée des anticorps, suivie d'une chute. Cette étude serait naturellement complétée par ailleurs par le dosage des anticorps neutralisants.

3° Y a-t-il des fausses réactions positives dans cette méthode ?

Nous ne pouvons encore l'affirmer, notre étude s'étant pratiquement limitée aux cas de poliomyélite clinique.

Nous avons mentionné ci-dessus les résultats obtenus chez des malades présentant des affections autres que méningo-encéphaliques ou paralytiques. Ainsi la réaction a été positive dans un cas d'ataxie cérébelleuse qui n'exclut pas l'intervention d'un virus poliomyélitique ; dans un autre cas où le malade avait présenté des troubles coronariens quatre mois auparavant, on peut penser qu'il avait pu faire une poliomyélite fruste dans l'intervalle, car la persistance des anticorps fixant le complément est exceptionnelle au bout de ce temps. Le cas des pharyngites vésiculeuses citées plus haut est intéressant à étudier à ce sujet. Chez les trois enfants atteints on a isolé, par inoculation aux souriceaux des extraits de selles, un virus Coxsackie type A₁. Or la fixation du complément effectuée avec les antigènes poliomyélitiques, dans le sérum prélevé deux mois après le début de l'affection à virus Coxsackie, s'est révélée positive. Il s'agissait en réalité, non pas d'une réaction de groupe non spécifique, mais d'une infection inapparente à virus poliomyélitique, comme en a témoigné l'apparition concomitante des anticorps neutralisants dont la spécificité est indiscutable. Néanmoins, il ne nous sera permis de conclure sur les cas de fausses réactions positives, que lorsque nos anti-

gènes seront obtenus en quantité suffisante pour nous permettre de prospecter le domaine des virus Coxsackie et autres entérovirus.



Nos recherches s'étant poursuivies en 1959, les résultats en seront publiés plus tard. Signalons seulement que, pour la période allant du 1^{er} janvier au 15 août, nous avons pu faire 48 réactions de fixation du complément chez des malades hébergeant un virus poliomyélitique retrouvé dans les matières fécales. Sur ces 48 réactions, 7 seulement ont été négatives, ce qui donne une concordance dans 85,6 p. 100 des cas et non plus dans 56 p. 100 comme en 1958. Cette différence nous semble due à la fois à l'amélioration des conditions de prélèvement et au perfectionnement de la technique de préparation de l'antigène. Il nous semble qu'une réaction donnant des résultats concordants dans cette proportion doit être considérée comme suffisamment valable pour entrer dans la routine du laboratoire de diagnostics.

RÉSUMÉ.

1° En utilisant la même technique que l'année précédente, il a été effectué en 1958, dans le Service des Virus de l'Institut Pasteur, **1711** essais d'isolement d'entérovirus par inoculation de cultures de cellules de reins de singe. Sur 294 résultats positifs, 270 provenaient de prélèvements de selles, 21 de prélèvements pharyngés et 3 du sang. Les 272 souches correspondantes se répartissent en **55** non poliomyélitiques et **217** poliomyélitiques, avec 71,4 p. 100 de type I, 6,5 p. 100 de type II et 22,1 p. 100 de type III.

2° Pour les entérovirus non poliomyélitiques, les résultats groupés des années 1957 et 1958 donnent un total de 85 souches, dont 22 Coxsackie B, en majorité du type B₃, 6 ECHO déterminés et 57 non encore identifiées.

3° La mise au point d'un antigène préparé sur culture de tissus pour chacun des trois types de virus poliomyélitique a permis de commencer une étude sérologique par la réaction de fixation du complément.

SUMMARY

STUDIES ON ENTEROVIRUSES IN MAN.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND SEROLOGICAL STUDIES, 1958.

1. By means of the technique already used in 1957 (inoculation of monkey kidney cell culture) the authors have carried out, in the Virus Department of the Pasteur Institute, **1711** attempts at

isolation of enteroviruses. **294** positive results have been obtained : **270** from stools, **21** from pharyngeal material, **3** from the blood. **272** strains were isolated : **55** strains of non-polioviruses, and **217** of polioviruses (type I : 71.4 % ; type II : 6.5 % ; type III : 22.1 %).

2. In 1957 and 1958 a total of 85 non polio-enteroviruses have been isolated : 22 Coxsackie B (B_3 for the most part), 6 identified ECHO viruses and 57 still untyped ECHO strains.

3. An antigen for each of the three types of polioviruses has been prepared in tissue culture, allowing to start a serological study now in progress by means of complement fixation reactions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LÉPINE (P.), BARSKI (G.), ENDO (M.) et BLUSSON (M^{lle} J.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1954, **138**, 50.
 - [2] LÉPINE (P.), BARSKI (G.) et ROBBE-FOSSAT (M^{me} F.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1956, **140**, 145.
 - [3] LÉPINE (P.), MAURIN (J.) et VIRAT (M^{me} J.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1958, **142**, 537.
 - [4] MAURIN (J.), VIRAT (M^{me} J.) et CARRÉ (M^{me} M.-C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 164.
 - [5] ZOURBAS (J.) et DROUHET (V.). *Sem. Hôp. Paris*, 1959, **35**, 1356.
 - [6] HENNESSEN (W.). *Deutsch. med. Wschr.*, 1955, **80**, 1044.
 - [7] SVEDMYR (A.), MELÉN (B.) et KJELLÉN (L.). *Acta med. scand.*, 1956, **154**, 20.
 - [8] LÉPINE (P.), SLIZÉWICZ (P.), DANIEL (P.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 654.
 - [9] MAYER (M. M.), OSLER (A. G.), BIER (O. G.) et HEIDELBERGER (M.). *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 535.
 - [10] BLACK (F. L.) et MELNICK (J. L.). *Yale J. Biol. Med.*, 1954, **26**, 385.
 - [11] SCHMIDT (N. J.) et LENNETTE (E. H.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 99.
-

**ÉTAT DU DIAGNOSTIC
DES INFECTIONS POLIOMYÉLITIQUES
PAR LA RÉACTION CINÉTIQUE
DE SÉRO-NEUTRALISATION
PENDANT LE MOIS DE SEPTEMBRE 1959**

par F. ROGER et A. ROGER (*).

(*Institut Pasteur, Service des Virus [D^r P. LÉPINE]*)

Du 24 août au 29 septembre 1959, le Laboratoire de Sérologie de la Poliomyélite a reçu 223 échantillons de sérum adressés dans un but de diagnostic étiologique, contre 495 prélèvements pour les onze mois précédents.

Il y a donc eu, pendant cette période, une augmentation considérable dans le nombre des prélèvements reçus, cette augmentation paraissant elle-même tenir à la fréquence classiquement accrue des infections poliomyélitiques pendant les mois d'août et septembre mais, aussi, à l'intérêt croissant du corps médical pour le diagnostic biologique des infections à virus entériques.

Les résultats obtenus grâce aux réactions de séro-neutralisation en cultures cellulaires ont été particulièrement bons et méritent, croyons-nous, d'être rapportés à titre comparatif à côté de ceux enregistrés par J. Maurin, M^{me} Carré et M^{me} Virat [3], ces auteurs ayant eu recours à d'autres techniques : isolement de la souche et fixation du complément.

I. — TECHNIQUE DES RÉACTIONS DE SÉRO-NEUTRALISATION.

Les sérums ont été examinés en cultures cellulaires (cellules KB [4]) en présence des virus poliomyélitiques dans une réaction de séro-neutralisation quantitative qui est, elle-même, une variante de la technique cinétique en tubes de Kahn verticaux et stationnaires, précédemment décrite à propos des réactions de type qualitatif [2].

On procède à la dilution des sérums à examiner de façon à obtenir une gamme échelonnée de 1/1 à 1/1024, avec un espace logarithmique constant de 0,3 log entre chaque dilution.

(*) Manuscrit reçu le 14 octobre 1959.

On continue ensuite comme dans le cas des séro-neutralisations qualitatives, mais en utilisant les dilutions sériques successives à la place des sérums individuels : on distribue donc 0,05 ml de sérum aux différentes dilutions dans des tubes de Kahn contenant déjà 0,45 ml de virus (s'il s'agit des tubes réactifs) ou de milieu (s'il s'agit des témoins sérums). On obtient ainsi des dilutions sériques terminales dix fois plus élevées que les dilutions originelles, de sorte que la gamme finale des dilutions s'étend de 1/10 à 1/10 240.

Pour l'expression numérique des résultats par rapport aux différents types de virus, chaque sérum est finalement caractérisé par la dilution correspondant à la limite de l'effet protecteur observé. Les autres conditions de la réaction (dosage des virus, quantité de cellules et d'huile de vaseline, disposition des témoins virus et des témoins cellules, système de lecture) sont par ailleurs absolument identiques à celles des réactions de type qualitatif (voir à ce sujet [2], p. 568 et 569).

II. — RÉSULTATS.

Les 223 échantillons de sérum correspondaient à 152 individus (81 personnes saignées une seule fois et 71 pour lesquelles nous avons reçu successivement deux prélèvements sériques).

EXCLUSION DE LA POLIOMYÉLITE. — Dans 8 cas, la poliomyélite a pu être *exclue* (1) en raison du titre extrêmement bas des anticorps plus de trois semaines après le début du syndrome, ou par suite de leur niveau absolument invariable.

RÉSULTATS POSITIFS. — Dans 53 cas, au contraire, le caractère relativement récent du contact avec un des trois virus poliomyélitiques pouvait être précisé, soit du fait d'un titre élevé, supérieur ou égal à 1/1 280 contre un seul type de virus, soit parce qu'il a été possible de suivre l'ascension des anticorps.

Pour 44 de ces 53 individus, le rôle étiologique d'un virus poliomyélitique a pu être affirmé du point de vue biologique parce que le niveau des anticorps était au moins égal à 1/5 120, ou parce que l'élévation des anticorps était supérieure à quatre fois d'un prélèvement à l'autre.

III. — ANALYSE DES RÉSULTATS.

A. PROPORTION DES DIAGNOSTICS SÉROLOGIQUES SELON LE NOMBRE DES PRÉLÈVEMENTS POUR CHAQUE INDIVIDU. — C'est donc, finalement, dans 52 cas, au total, que nous avons pu affirmer ou

(1) Il s'agissait d'un syndrome grippal, de 3 syndromes méningés, d'une paralysie faciale post-anesthésique, d'une monoplégie et de 2 encéphalites.

infirmier la poliomyélite (44 infections poliomyélitiques et 8 exclusions), ce qui représente un « rendement » en résultats valables légèrement supérieur au tiers des individus examinés (voir tableau I).

TABLEAU I. — Proportion des diagnostics sérologiques selon le nombre des prélèvements pour chaque individu.

	Individus examinés une fois	Individus examinés 2 fois	Total des individus examinés	Nombre de prélèvements
Nombre des individus	81	71	152	223
Conclusions fermes	16	36	52	88
% de conclusions valables #	20	51	34	40

Le tableau I permet aussi de se rendre compte de l'augmentation dans la proportion des diagnostics sérologiques lorsqu'on dispose de deux prélèvements successifs de sérum pour un même individu (1/5 des cas pour les prélèvements uniques ; la moitié pour les doubles prélèvements). Encore, ce rendement aurait-il pu être augmenté sensiblement si les dates des prélèvements doubles avaient été, dans l'ensemble, mieux choisies (le premier étant effectué dès constatation du syndrome clinique et le deuxième trois à quatre semaines plus tard) et si les renseignements indispensables sur l'âge du malade, la date de début de la maladie ou la date des prélèvements avaient été obtenus avec une plus grande régularité.

B. RÉPARTITION PAR TYPES ET PAR SYNDROMES. — Pour les 44 cas, nous avons le groupement suivant :

Type I (16 cas) : 4 méningites lymphocytaires, 2 parésies à récupération rapide, 10 paralysies caractérisées (2 paralysies faciales ; 6 monoplégies réparties également entre les membres supérieurs et les membres inférieurs ; 2 paraplégies compliquées, l'une, d'une atteinte des muscles de la nuque ; l'autre, d'une atteinte des muscles respiratoires).

Type II (11 cas) : 7 méningites lymphocytaires, 4 paralysies (1 paralysie faciale, 1 monoplégie, 1 atteinte assez grave des muscles de la colonne, 1 cas progressif mortel).

Type III (17 cas) : 9 méningites lymphocytaires, 1 syndrome infectieux avec myalgies, 1 pharyngite fébrile chez un sujet contact, 6 paralysies (2 paralysies faciales, 3 monoplégies et 1 hémip légie).

Du point de vue des types sérologiques, la répartition des infections poliomyélitiques a donc été beaucoup moins déséqui-

librée en août et septembre 1959 qu'elle ne l'est ordinairement en période d'épidémie.

Du point de vue des syndromes, il y a eu presque autant de syndromes méningés que de paralysies (20 contre 22).

Le type I est proportionnellement responsable d'un plus grand nombre de complications paralytiques nettement individualisées (10 cas à lui seul contre 10 pour les deux autres types).

Les types II et III sont, dans l'ensemble, demeurés davantage au stade de méningite lymphocytaire (16 cas pour ces deux types contre 4 pour le type I).

Le nombre des paralysies faciales a été assez élevé (5 cas).

C. RÉPARTITION PAR AGE. — Si l'on analyse les résultats de ce point de vue, en se bornant aux individus pour lesquels nous avons pu obtenir ce renseignement, on peut noter qu'il n'y a que 2 cas après 17 ans (1 type I à 29 ans et 1 type II à 32 ans).

Pour le type I, 12 cas sur 16 ont été observés avant l'âge de 5 ans et 3 de 11 à 12 ans.

Le type II est responsable de 4 cas entre 13 et 16 ans ; de 2 cas observés à l'âge de 7 ans et d'1 cas chez un nourrisson (autres cas sans précision d'âge).

Pour le type III, il y a eu 4 cas avant l'âge de 5 ans, le reste étant réparti assez également entre la sixième et la douzième année.

D. RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE. — *Région parisienne* : 19 cas (5 de type I, 4 de type II et 10 de type III).

Mulhouse : 8 cas (3 de type I, 2 de type II et 3 de type III).

Angers : 7 cas (4 de type I, 1 de type II et 2 de type III).

Les autres sont répartis dans les villes suivantes : Beauvais, Berck, Bourges, Rouen (type I), Poitiers, Rennes (type II), Besançon, Limoges, Nice et Saint-Lô (type III).

E. CAS PARTICULIÈREMENT INTÉRESSANTS. — Ils sont au nombre de 4.

Le premier est celui d'un *enfant de 2 ans 1/2 vacciné contre la poliomyélite*, mais chez qui la vaccination n'avait fait apparaître aucun anticorps sérique (paralyse faciale isolée, type III).

Le deuxième, assez curieux, correspondait à une *paralyse du deltoïde* chez un enfant de 17 mois, vacciné tout récemment contre la variole (scarifications profondes en regard du muscle paralysé).

Les deux derniers se présentaient comme une *complication de maladies infectieuses*, l'une assez tardive dans un cas de coque-

luche (malade de 2 ans, paraplégie, virus de type I), l'autre mortel en pleine évolution d'une rougeole (paralysie progressive avec atteinte des muscles de la nuque puis des membres supérieurs chez un enfant de 2 ans 1/2, type II).

RÉSUMÉ.

Les résultats obtenus pendant le mois de septembre 1959 démontrent la valeur de la technique cinétique de séro-neutralisation dans le diagnostic de laboratoire des infections à virus poliomyélitique.

La proportion des conclusions fermes peut, en effet atteindre ou dépasser 50 p. 100 des individus examinés, notamment lorsqu'on dispose de deux prélèvements sériques correctement espacés dans le temps.

SUMMARY

THE DIAGNOSTIC OF POLIO INFECTIONS BY MEANS OF THE CINETIC SERONEUTRALIZATION REACTION DURING SEPTEMBER 1959.

The results obtained during September 1959 demonstrate the validity of the cinetic seroneutralization reaction for the laboratory diagnostic of polio infections.

This technique allows definite conclusions in more than 50 % of the individuals studied, particularly when blood has been taken twice at right intervals.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EAGLE (H.), HABEL (K.), ROWE (W. P.) et HUEBNER (R. J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **91**, 361.
 - [2] LÉPINE (P.), ROGER (F.) et ROGER (A.). *Bull. Org. mond. Santé*, 1959, **20**, 563.
 - [3] MAURIN (J.), CARRÉ (M^{me} M.-C.) et VIRAT (M^{me} J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960.
-

ÉTUDE ÉTIOLOGIQUE DES INFLAMMATIONS AIGÜES DES VOIES AÉRIENNES SUPÉRIEURES CHEZ LES NOURRISSONS

DESCRIPTION DE DEUX FOYERS ÉPIDÉMIQUES,
DUS RESPECTIVEMENT A L'INFECTION PAR UN ADÉNOVIRUS TYPE 2
ET PAR UN VIRUS POLIOMYÉLITIQUE TYPE 2

par A. FELICI, A. GINEVRI et F. FRANCO (*).

(Service des Virus de l'Istituto Superiore di Sanità, Roma)

INTRODUCTION ET ASPECT CLINIQUE.

Au cours de la première quinzaine d'août 1957, nous avons étudié deux foyers épidémiques circonscrits qui se sont produits, le premier, dans la section « nourrissons » de l'Hôpital Sainte-Marie de la Pitié à Venise, le second, chez des nouveau-nés de l'Hôpital à la Mer, dans la même ville.

Dans le premier cas, il s'agissait d'un syndrome infectieux, caractérisé par de la fièvre, de l'angine érythémateuse et de la diarrhée. Cette forme clinique, exception faite pour la fréquence élevée de la symptomatologie gastro-entérique, ne présentait pas de différences significatives avec les formes cliniques analogues, existant en même temps dans la même communauté et pour lesquelles le diagnostic virologique de grippe asiatique se trouva par la suite confirmé [4].

Le second foyer se distinguait par une rhinopharyngite aiguë de caractère léger.

Les deux épidémies furent caractérisées par la rapidité d'évolution du syndrome. La durée moyenne de la maladie a varié entre deux et six jours. Dans tous les cas dus à une infection par l'adénovirus type 2 il y eut une élévation de température comprise entre 37° 5 et 39° 7 C, et, dans la moitié de ces cas, nous avons vu se produire, à côté des symptômes cliniques fondamentaux, une diarrhée durant de deux à quatre jours.

Les cas de rhinopharyngite aiguë se sont manifestés sans élévation de température, excepté dans deux cas, où il y eut une légère élévation thermique (entre 37° 2 et 37° 5 C). Dans aucun cas il n'y eut de diarrhée.

(*) Manuscrit reçu le 16 juillet 1959.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1° **PRODUITS PATHOLOGIQUES.** — Nous avons prélevé des échantillons de liquide de lavage pharyngés, de matières fécales et de sérum : deux échantillons de sérum ont été recueillis, le premier, au cours de la phase initiale de la maladie et le second, dix jours plus tard.

2° **CULTURES DE TISSUS.** — Plusieurs souches de virus ont été isolées par l'emploi de cultures primaires de cellules épithéliales de rein de singe *rhesus*. Le spectre de cytopathogénicité de l'adénovirus type 2 a été étudié en employant des repiquages de cultures des tissus suivants : carcinome du col utérin (HeLa, Gey), carcinome de l'arrière-bouche (KB, Eagle), épithélium rénal humain en culture continue (PF, Rita), cellules en culture continue de cœur de singe (MH, Salk).

Les cultures de tissus en culture continue employées étaient constituées de souches cultivées dans notre laboratoire depuis différentes périodes : HeLa, KB depuis environ trois ans, PF depuis deux ans environ, MH, depuis six mois environ. Elles ont été entraînées à se développer sur un milieu nutritif commun.

Milieu de croissance :

Sérum bovin	10 %
Hydrolysate de lactalbumine 5 %	5 %
Solution de Hanks tamponnée	85 %
Extrait de levure 10 %	0,2 %
Antibiotiques (pénicilline 100 U.O./cm ³ streptomycine 50 µg/cm ³	50

Milieu d'entretien :

Sérum bovin	5 %
Hydrolysate de lactalbumine 5 %	5 %
Solution de Hanks tamponnée	90 %
Antibiotiques, comme plus haut.	

3° **TECHNIQUE DES ISOLEMENTS ET TYPAGE DES SOUCHES.** — Pour l'isolement, nous avons employé les techniques habituelles de laboratoire ; pour l'identification des virus isolés nous avons utilisé tantôt la réaction de déviation du complément, au moyen d'un sérum anti-adénovirus humain de référence, tantôt la réaction de neutralisation au moyen d'antisérums connus à l'égard des trois types de virus poliomyélitiques. L'identification du type d'adénovirus et le contrôle de pureté de l'isolement ont été faits au moyen de sérums neutralisants anti-adénovirus types 1 à 14.

4° **RÉACTIONS SÉROLOGIQUES.** — Nous avons exécuté la réaction de fixation du complément par la microméthode sur plateau de perspex [2] et la réaction de neutralisation selon les méthodes standards [3].

Pour l'antigène adénovirus nous nous sommes servis du liquide provenant de cultures de cellules KB infectées avec l'adénovirus type 5 ; pour les antigènes poliomyélitiques fut employé le liquide de culture

d'épithélium de rein de singe infectée préalablement, purifié par du fluorocarbure (Genetron 113) [4] et inactivé par du formol à 1/4 000.

5° ANIMAUX. — Tous les produits pathologiques étudiés ont été inoculés chez la souris nouveau-née (par voie intrapéritonéale) et dans l'œuf embryonné de poulet au douzième jour d'incubation (par voie amniotique).

RÉSULTATS.

A) Foyer circonscrit d'adénovirus type 2.

a) ISOLEMENT ET CARACTÉRISTIQUES DES SOUCHES ISOLÉES. — Sur les dix cas soumis à l'étude nous avons isolé huit souches d'un adénovirus type 2, dont quatre provenant d'échantillons de matières fécales, et quatre d'échantillons de liquide pharyngé.

TABLEAU I. — Epidémie circonscrite d'adénovirus type 2. Réciproque du titre des anticorps déviant le complément et neutralisant l'adénovirus type 2 en rapport avec la date du commencement de la maladie.

Cas n°	Nombre de jours depuis le début de la maladie	RFC*	RN**
314	7	16	4
	15	16	64
315	5	16	4
	13	16	64
316	6	4	8
	14	16	32
317	7	32	64
	15	32	64
318	8	4	4
	16	64	128
319	7	4	16
	15	8	16
320	6	4	8
	14	8	32
321	8	4	8
	16	64	128
322	4	16	32
	12	16	32
323	7	4	8
	15	16	32

* = Réaction de fixation du complément ** = Réaction de neutralisation.

L'effet cytopathogène s'est manifesté dans la culture d'isolement, en moyenne dix jours après l'inoculation, exception faite pour le cas 320 TR où l'effet est apparu au deuxième jour. Au cours des passages successifs, ce délai est progressivement réduit, pour s'établir, après le quatrième passage, aux environs de trois jours.

Après des passages répétés sur culture d'épithélium de rein de

singe, malgré l'accélération des délais d'apparition de l'effet cytopathogène, le titre infectant 50 p. 100 du virus s'est maintenu assez bas, aux environs de 10^{-2} - $10^{-2,5}$ /0,1 ml, ce qui confirme, d'une part, la possibilité réduite d'adaptation des adénovirus humains aux cultures de tissus provenant du singe et, d'autre part, la dissociation entre l'effet cytopathogène et le titre atteint [5]. Toutes les souches isolées se sont montrées cytopathogènes pour les diverses lignées cellulaires employées (tableau I).

b) RECHERCHES SÉROLOGIQUES. — Le diagnostic d'infection par adénovirus chez les malades a été effectué au moyen de la réaction de fixation du complément. Les titres obtenus n'ont généralement pas dépassé la valeur de 1/64.

Les résultats des recherches sérologiques se trouvent réunis sur le tableau I.

TABLEAU II. — Epidémie circonscrite de virus poliomyélitique type 2. Réciproque du titre des anticorps déviant le complément et neutralisants antipoliomyélitiques, en rapport avec la date du commencement de la maladie.

Cas n°	Nombre de jours depuis le début de la maladie	RFC			RN		
		Type 1	Type 2	Type 3	Type 1	Type 2	Type 3
350	2	4	4	4	4	64	4
	10	16	16	16	4	1024	4
351	6	4	4	4	4	64	16
	14	16	4	4	4	1024	16
352	2	4	4	4	4	4	4
	10	4	8	8	4	64	4
353	4	4	4	4	4	64	16
	12	4	4	4	4	1024	16
354	3	4	4	4	4	128	4
	11	4	4	4	16	1024	8
355	1	4	4	4	16	128	16
	9	16	32	4	16	1024	16

B) Foyer circonscrit de virus poliomyélitique type 2.

a) ISOLEMENT ET RECHERCHES SÉROLOGIQUES. — Des six cas étudiés, nous avons isolé huit souches d'un virus poliomyélitique type 2, parmi lesquelles quatre provenant de liquide pharyngé et quatre de matières fécales ; dans trois cas, deux souches de virus furent isolées du même sujet.

Les résultats des recherches sérologiques sont rassemblés sur le tableau II.

TABLÉAU III. — Pouvoir cytopathogène des différentes souches d'adénovirus type 2 isolées.

Cas n°	MH	KB	PF	HeLa
315	*TF + (+)	+ (+)	± (+)	+ (+)
	**TR + (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
316 TF	+ (+)	+ (+)	+ (+)	± (+)
319 TF	+ (+)	+ (+)	+ (+)	± (+)
320	TF + (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)
	TR ± (+)	± (+)	+ (+)	+ (+)
322	TF + (+)	+ (+)	± (+)	+ (+)
	TR + (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)

La positivité se réfère à l'apparition de l'effet cytopathogène. Les signes entre parenthèses représentent les résultats de l'épreuve faite successivement sur reins de singe. * TF = Tampon pharyngé ; ** TR = Tampon rectal.

DISCUSSION.

De l'ensemble des données cliniques recueillies et des résultats virologiques obtenus, on peut tirer les conclusions suivantes :

1° Les deux foyers se sont développés avec une rapidité notable : quatre jours seulement ont séparé le premier du dernier cas de maladie.

2° Dans chaque foyer, tous les malades ont présenté la même symptomatologie fondamentale.

3° Dans les deux circonstances, l'isolement d'une souche du même type a été obtenu à partir d'un nombre élevé de malades, en particulier du liquide de lavage pharyngé.

4° La presque totalité des malades a présenté, à la suite de l'infection, une élévation du taux des anticorps à l'égard du virus isolé.

5° L'investigation virologique, comprenant l'isolement d'une souche d'adénovirus type 2 et d'un virus poliomyélitique type 2, et l'impossibilité que nous avons pu constater d'infecter avec les produits dont furent isolés ces virus aussi bien les souris nouveau-nées que les œufs embryonnés de poulet, a écarté le rôle étiologique éventuel d'un autre virus responsable de syndromes cliniques analogues, tel que le virus Coxsackie, les virus ECHO ou la souche asiatique du virus grippal.

L'éventualité d'une infection mixte avec la souche asiatique du

virus grippal, souche que nous avons isolée à la même époque dans la ville de Venise, a été ultérieurement rejetée, la recherche sérologique n'ayant montré en aucun des cas étudiés une augmentation du titre des anticorps déviant le complément en présence de ce virus ou des anticorps inhibant l'hémagglutination. Nos observations et les résultats de notre étude semblent nous autoriser à admettre l'existence de syndromes cliniques sans gravité qu'on peut considérer comme manifestations d'une pathologie d'été due à l'un ou à l'autre des deux groupes de virus : adénovirus et virus poliomyélitiques.

En ce qui concerne les adénovirus, notre expérience actuelle se rattache à deux nourrissons atteints de diarrhée, cas que nous avons étudiés en 1956, où l'examen sérologique a montré qu'il s'agissait d'une infection par adénovirus et où nous avons pu isoler une souche du type 2 et une souche du type 7.

Il est intéressant de souligner que les deux types de virus isolés par nous en cette étude ont été déjà associés à des aspects cliniques analogues à ceux que présentaient nos malades, exception faite pour le syndrome diarrhéique dans les cas d'infection par adénovirus.

On connaît en effet l'épidémiologie particulière du type 2 des adénovirus : ce virus a été isolé en particulier au cours d'épidémies de maladies respiratoires parmi des groupes d'enfants [6].

Au contraire, on est frappé par l'isolement du type 2 du virus poliomyélitique chez des nourrissons atteints de rhinopharyngite aiguë, en l'absence de toute autre manifestation clinique de la poliomyélite. Il est intéressant de rappeler qu'en Allemagne, on a isolé le même type de virus poliomyélitique dans des circonstances analogues [7].

L'association entre virus entériques et foyers épidémiques d'été de rhinopharyngite aiguë chez les nourrissons a été également remarquée à l'occasion de la découverte d'un virus entérique d'un type nouveau [8].

Enfin, les résultats obtenus par la réaction de déviation du complément avec les antigènes poliomyélitiques nous ont confirmé la non-spécificité des anticorps déviant le complément, qui se produisent à brève distance de l'infection [9].

RÉSUMÉ.

Au mois d'août 1957 se produisirent dans la ville de Venise (Italie) deux petits foyers épidémiques dans des hôpitaux différents, chez des nourrissons âgés de 5 à 14 mois.

Dans un cas il s'agissait d'un syndrome caractérisé par de la fièvre, une angine érythémateuse et de la diarrhée ; dans l'autre, d'une rhinopharyngite aiguë, de caractère bénin. Plusieurs souches

d'adénovirus type 2 et de poliovirus type 2 furent isolées dans le premier et dans le second foyer.

L'isolement du virus a été possible avec la même fréquence à partir des liquides de lavage de gorge et à partir des matières fécales.

Les résultats sérologiques étaient concordants, dans les deux cas, avec le rôle étiologique probable du virus à l'égard des syndromes observés.

SUMMARY

AN INVESTIGATION OF THE ETIOLOGY OF ACUTE INFLAMMATIONS OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT IN INFANTS.

Two small outbreaks of a disease of the upper respiratory tract in infants from 5 to 14 months old, were observed in two different hospitals in Venice (Italy), during the month of August 1957. Erythematous angina with fever and diarrhea were the main symptoms in one episode, while the other was simply characterized by acute benign rhinopharyngitis.

In the first of these outbreaks several strains of a type 2 adenovirus were isolated, whereas type 2 poliovirus was found in the second.

The frequency of isolation was the same both from the throat washings and the stool specimens.

Serological results supported the etiological role of the isolated viruses in both outbreaks.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FELICI (A.), FRANCO (F.) et MANCINI (G.). *R. C. Ist. sup. Sanità*, 1959, **22**, 356.
- [2] FULTON (F.) et DUMBELL (K. R.). *J. gen. Microbiol.*, 1949, **97**, 3.
- [3] *American Public Health Association. Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases*, 1956, 2^e édit.
- [4] HALONEN (P.), HUEBNER (R. J.) et TURNER (H. C.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1958, **97**, 530.
- [5] ROWE (W. P.), HARTLEY (J. W.) et HUEBNER (R. J.). *Proc. Soc. exp. Biol.* 1958, **97**, 465.
- [6] HUEBNER (R. J.). *Modern Med.*, 1958, **5**, 1193.
- [7] SCHALL (L.), LENNARTZ (H.) et HAKE (R.). *Münch. med. Wschr.*, 1956, **98**, 1432.
- [8] CRAMBLETT (H. G.), ROSEN (L.), PARROT (R. H.), BELL (J. A.), HUEBNER (R. J.) et MC CULLOUGH (N. E.). *Pediatrics*, 1958, **21**, 168.
- [9] PAUL (J. R.) In *American Public Health Association. Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases*, 1956, 2^e édit., p. 89.

A PROPOS DE LA FLORE DE SOUILLURE DES PRODUITS INJECTABLES IMMUNOBIOLOGIQUES

par Jean DESBORDES (*).

*(Laboratoire National de la Santé Publique,
25, boulevard Saint-Jacques, Paris)*

L'une des fonctions les plus importantes d'un laboratoire chargé de la surveillance des produits injectables est, à nos yeux, le contrôle de la stérilité des produits d'origine fongique et microbienne, ou sanguine d'origine humaine et animale, etc. Le choix des techniques à mettre en œuvre a fait l'objet de nombreux débats d'audience internationale [47]. L'unité de vue n'est pas encore faite, bien que de nombreux progrès vers une standardisation aient été faits récemment. Cependant, il nous semble, qu'afin de mettre en œuvre à bon escient les techniques les plus adéquates, il faut bien connaître ce qu'il faut rechercher. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant, compte tenu des résultats d'un certain nombre de publications dans le monde, d'analyser les résultats de divers contrôles.

C'est ce que nous avons fait récemment.

1° En ce qui nous concerne, nous avons relevé dans nos cahiers de laboratoire personnels les germes de souillure le plus souvent retrouvés dans différents échantillons soumis à notre avis. Signalons tout de suite que, d'une façon générale, et nous le regrettons, nous n'avons pas approfondi le diagnostic bactériologique, nous contentant de la précision du genre. Entre 1949 et 1959, sur 106 examens relatifs à des souillures, nous avons obtenu les résultats relevés au tableau I. De plus, nous avons observé la présence d'un certain nombre de levures et de moisissures poussant sur milieux classiques solides ou liquides, mais que nous n'avons pas identifiées. Sur ces 106 résultats, nous avons isolé 69 germes aérobies et 27 anaérobies. Parmi les aérobies, nous relevons 37 germes Gram-positifs et 32 germes Gram-négatifs. Parmi ceux-ci, 8 poussaient au dessous de 37°.

2° De tels résultats peuvent être complétés par l'analyse des travaux antérieurs. En France, deux travaux récents, l'un d'Hélène

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} octobre 1959.

TABLEAU I. — Souillures relevées personnellement entre 1949 et 1959.

GENRE	Nom	Nombre de fois
Staphylococcus	Staphylocoques divers	12
Streptococcus	Cocci type entérocoques	3
Sarcina	Sarcines	10
Escherichiae	Bacille Gram négatif	6
Aerobacter	Aerobacter aerogenes	8
Pseudomonas	Pseudomonas	10
Chromobacteriaceae	Chromobacteriaceae	8
Bacillus	Bacille sporulé type subtilis	12
Staphylocoques anaérobies		3
Sphaerophorus -(anaérobie)		6
Actinobacterium (anaérobie)		10
Corynebacterium (anaérobie)		8

Lartigue (Bordeaux, 1957) [10], l'autre de Bonnel et Raby (Rome, 1958) [4], ont trait aux produits d'origine sanguine. On peut en tirer les observations suivantes :

a) *En ce qui concerne la température de pousse*, le travail de M^{me} Lartigue fait la synthèse des publications parues avant la sienne, en particulier celle de Steven [20], celle de Margaret Pittman [18] et celle de Matthes [13]. On peut constater que beaucoup de germes, Gram-négatifs en particulier, ont non seulement la propriété de croître et de se multiplier à température inférieure à 37°, mais sont inhibés à 37°. C'est ainsi que d'après Steven [20], sur 14 observations, 8 germes (*Flavobacterium* et *Pseudomonas*) ne poussent pas à 37°, mais 11 poussent à 6°. D'après Margaret Pittman [18], sur 11 germes, 6 ne poussent pas à 37° (5 y poussant), 10 poussent au-dessous de 37° (un seul n'y poussant pas), les cultures au-dessous de 37° s'échelonnant entre 32° et 25°. Notons que tous les germes poussent bien entre 30° et 25°.

Bonnel et Raby [4], sur 76 identifications de germes divers, notent 44 cultures poussant à 20° contre 31 poussant à 37° (avec isolement d'un germe thermophile, *Pseudomonas fluorescens*, poussant à 50°) [1].

En 1955, Sykes [21], à Londres, avait abouti aux mêmes conclusions, les souillures répétées par les « coliformes » et les « psychrophilic organisms » entraînant l'obligation de pratiquer des cultures à 20-25° aussi bien qu'à 37°.

b) *En ce qui concerne l'anaérobiose et les champignons*, Bonnel et Raby [3, 4] pensent démontrer la nécessité de rechercher la présence éventuelle des germes anaérobies par le fait qu'en quelques mois (novembre 1957-février 1958) ils identifient quatre Corynébactéries anaérobies. Ces mêmes auteurs soulignent aussi

l'intérêt de la recherche des contaminations par moisissures et levures. Ils signalent 63 contrôles positifs pour levures et *Penicillium*.

Pour Sykes (Londres, 1955) [21], les possibilités de contamination par divers *Clostridium* nécessitent les cultures en milieux pour anaérobies, et la présence parfois constatée de champignons (moulds and yeasts) entraîne l'impératif de pratiquer des cultures sur milieux spéciaux.

Après bien d'autres, en 1956, Benkovic et Higgy-Mandic [4], de Zagreb, insistent sur l'importance de l'utilisation de milieux anaérobies et de milieux pour moisissures et levures. Enfin, diverses publications que nous ne pouvons analyser ici concluent dans le même sens (voir en particulier les comptes rendus de plusieurs congrès spécialisés) [6, 12, 17].

On peut dresser le tableau II résumant l'ensemble de ces résultats.

TABLEAU II. — Détail des germes relevés par trois auteurs différents.

Auteurs	Germes aéro- bics Gram +	Germes aéro- bics Gram -	Germes anaérobies	Champignons
Statistique de Madame Lartigue	13	74	-	-
Statistique de P. BONNEL	22	26	4	63
Statistique de J. DESBORDES	37	32	27	Non calculé
	72	132	31	63

Ce qui nous frappe, comme tous ceux qui se sont occupés de la même question [3, 4, 5], ce sont les modifications apportées à nos connaissances anciennes de la flore de souillure. Il est incontestable que les flores citées par les auteurs anciens ne correspondent pas à ce que nous rencontrons [9, 11, 14, 16, 19]. Peut-être s'agit-il là d'une modification de l'équilibre biologique du monde vivant, *sans doute sous l'influence des antibiotiques*.

Conséquence de ces faits : la flore étant modifiée, *sa recherche* doit l'être également : compte tenu du champ restreint des recherches exposées ici (on ne s'est occupé ni des germes thermophiles, ni des virus, ni des rickettsies, par exemple), il convient d'effectuer un contrôle en utilisant des milieux adéquats, un pour chaque spécialité : aérobies, anaérobies et champignons, sans oublier les cultures pratiquées à des températures plus basses que 37°.

On peut dresser un tableau comparatif de la flore de souillure (tableau III), qui permet de voir que certains germes ont disparu et que d'autres sont apparus, lors de nos contrôles tout au moins. Il n'est pas sans intérêt de souligner un phénomène semblable en ce qui concerne la flore atmosphérique d'une grande ville (tableau III).

TABLEAU III.

	Flore de souillure la plus souvent citée dans les ouvrages classiques. (9 - 11 - 14 - 15 - 16)	Flore trouvée actuelle- ment le plus souvent	Champignons de souillure (peu cités par les auteurs anciens)
Aérobies	Nombreux bacilles Gram + type Subtilis. Streptocoques et entéro- coques Gram + Staphylocoques Gram + Colibacilles Gram +	Genre Chromo. et achromo. Gram - Genre Pseudomonas Gram - Genre Alcaligenes Gram - Genre Aerobacter Gram - Genre Moraxella Gram - Staphylocoque et entéro- coque Gram + Genre Escherichia Gram -	Penicillium & Levures diverses
Anaérobies	Clostridiales Streptocoque anaérobies Ristellaceae (genre Ristella) Veillonella & Neisseriaceae anaérobies	Spherophorus et autres Actinobactériales Ramibacterium Corynebactériales anaérobies Actinobacterium	
	Flore isolée dans l'air parisien en 1912 (Satory & Langlais) (12)	Flore isolée dans l'air parisien en 1955 (Besson & Desbordes) (2)	
	Micrococcus divers (4 germes) Bacillus divers (4 germes) Bacillus Proteus	Sarcine Staphylocoques (2 germes) Bacillus Subtilis	
	Divers Mucorinées Endomyces Divers aspergillus Divers penicillium & sterigmatocystis. Divers Mucidinées.	Divers champignons des genres : Debaryomyces, Hormodendron; Verticillium, Torulopsis, Aspergillus.	

Il semble donc bien que l'on assiste à l'heure actuelle à une modification de la flore de souillure susceptible de contaminer diverses préparations injectables à l'homme.

Cependant, des recherches ultérieures devraient préciser certains des points soulignés ici, et on ne doit pas exclure l'hypothèse que les recherches, lors des travaux anciens, étaient insuffisantes au point de vue des techniques d'isolement mises en œuvre (milieux et température d'étuve).

CONCLUSION.

L'analyse de diverses publications faites depuis une quinzaine d'années au sujet de la flore de souillure des produits injectables semble révéler une modification majeure des germes retrouvés lors de contrôles divers.

Il nous paraît possible, d'une part, de mettre en évidence de nombreux microorganismes anaérobies et des champignons inférieurs (levures et moisissures, peu signalées par les auteurs anciens), et, d'autre part, d'observer que la flore aérobie anciennement à prédominance de germes Gram-positifs, poussant à 37°, est maintenant à prédominance de germes Gram-négatifs, avec de nombreux germes poussant au-dessous de 37°. Il semble que la flore la plus souvent signalée soit maintenant :

a) En anaérobiose : *Spherophorus* et autres actinobactériales, corynebactériales anaérobies, *Actinobacterium*.

b) En aérobiose : cocci Gram+ (staphylocoques et entérocoques) et surtout flore Gram— (*Esch. coli* et assimilés, germes *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Proteus* et *Pseudomonas* et tribus des *Achromobactereae* et *Chromobactereae*).

On est en droit d'en déduire des conséquences en ce qui concerne les techniques nouvelles à mettre en œuvre pour pratiquer le contrôle des produits immuno-biologiques et d'origine sanguine.

SUMMARY

STUDY OF THE FLORA CONTAMINATING INJECTABLE
IMMUNO-BIOLOGICAL MATERIALS.

The analysis of various papers published in the course of the last 15 years about this flora seems to show a very important modification of the germs found in different controls.

It seems possible :

1. To demonstrate many anaerobic microorganisms and lower fungi (yeasts and moulds) which were not or rarely mentioned by former authors.

2. To notice that the aerobic flora which formerly was predominantly Gram+ developing at 37°, is now predominantly Gram—, with many germs developing under 37°.

It seems that the flora now most frequently observed is :

a) In anaerobiosis : *Spherophorus* and other Actinobacteriales, anaerobic Corynebacteriales, *Actinobacterium*.

a) In aerobiosis : Gram +, cocci (*Staphylococcus* and *Enterococcus*), but above all a Gram — flora (*E. coli*, *Aerobacter*, *Alca-*

ligenes, *Proteus*, *Pseudomonas*, and *Achromobactereae* and *Chromobactereae* tribes.

These findings show the obligation to use new techniques to control immunobiological and blood materials.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BENKOVIC (J.) et coll. *Farmaceut. Glasnika*, 1956, **12**, 183.
 - [2] BESSON (A.), DESBORDES (J.) et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 54.
 - [3] BONNEL (P.) et RABY (C.). *Transf.*, 1958, **1**, 55.
 - [4] BONNEL (P.) et RABY (C.). *Proc. 7th Congress intern. Soc. Blood Transf.*, Rome, 1958, S. Karger, édit., Bâle, 317.
 - [5] BOURGAIN (M.) et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 361.
 - [6] DESBORDES (J.). *C. R. Feder. Intern. Pharm.*, XVI^e Assembl. gén., Londres, 1955.
 - [7] DESBORDES (J.). *Prod. Pharm.*, 1956, **11**, 159.
 - [8] DESBORDES (J.) et GUYOTJEANNIN (Ch.). *Ann. Pharm. Franç.*, 1952, **10**, 628.
 - [9] FRANKLAND (P.). *Proc. Royal Soc.*, 1886, **40**, 509.
 - [10] LARTIGUE (H.). *Contribution à l'étude des accidents dus à l'injection de sang infecté*, Bordeaux, 1957, E. Drouillard, édit.
 - [11] LAVERAND. *Méd. mod.*, 1890, **12**, 221.
 - [12] LEBOURDELLÈS (B.) et DESBORDES (J.). *Rev. Hyg.*, 1957, **5**, 3 ; 1958, **6**, 329 et 44.
 - [13] MATTHES. V^e Congrès int. *Transf. sang.*, Paris, 1954, 567.
 - [14] MIQUEL (P.). *Les organismes vivants de l'atmosphère*, Paris, 1883.
 - [15] MOLLISON (P. L.). *Blood transfusion in clinical Medicine*, Springfield, 1951, Ch. Thomas, édit.
 - [16] PASTEUR (L.). *Ann. Chim. Phys.*, **64**, 5, 28 et 33.
 - [17] Procès-verbal du 1^{er} R. I. S. B., Lyon 1955 ; Procès-verbal du 2^e R. I. S. B., Rome, 1956 ; Procès-verbal du 3^e R. I. S. B., Opatija, 1957 ; Procès-verbal du 4^e R. I. S. B., Bruxelles, 1958.
 - [18] PITTMAN (M.). *J. Lab. clin. Med.*, 1953, **42**, 273.
 - [19] SARTORY (A.) et LANGLAIS (M.). *Poussières et microbes de l'air*, Paris, 1912, Poinat, édit.
 - [20] STEVEN (A. R.). *Ann. int. Med.*, 1953, **39**, 1228.
 - [21] SYKES (G.). *C. R. Fédér. intern. Pharm.*, XVI^e Assembl. gén., Londres, 1955.
-

FIXATION COMPARÉE DU RADIOPHOSPHORE PAR DES BACTÉRIES VIVANTES ET DES BACTÉRIES TUÉES

par A. GUELIN et P. LÉPINE (*).

(Institut Pasteur)

Le phosphore radioactif est souvent introduit dans une culture en voie de développement pour obtenir, aux dépens des bactéries qui l'ont assimilé, un bactériophage marqué.

Cependant, Bonét-Maury et Deysine (1953) ont suggéré que la radioactivité des bactéries vivantes pourrait être due surtout à une fixation du phosphore à leur surface. Tubiana (1953), Sternberg et Podoski (1953), Sternberg et Frappier (1956) insistent de même sur la possibilité d'adsorption du ^{32}P . Dans ce cas, la radioactivité des corpuscules bactériophages obtenus aux dépens de tels germes ne serait pas entièrement le résultat de l'intégration métabolique du radiophosphore ; elle pourrait également être due à l'adsorption du ^{32}P à la surface des corpuscules. Cette fixation de P, facilement influencée par les conditions extérieures, rendrait aléatoire son emploi comme traceur de germes marqués et pourrait aussi compromettre l'étude quantitative du métabolisme du complexe phage-bactérie.

Pour essayer d'évaluer l'ordre de grandeur de la fixation (1) du phosphore minéral en dehors de toute assimilation, nous avons fait une étude comparative de sa fixation par des bactéries en croissance et par des bactéries à l'état stationnaire ou tuées.

MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Nous avons utilisé la souche de *Shigella dysenteriae* Y6R et, comme milieu, une solution de peptone toujours d'un même échantillon (1 : 1 000, avec $\text{pH} = 7$), sans addition d'autres éléments pour ne pas influencer l'adsorption du phosphore par un excès de sels minéraux (Rothstein, 1957). Le milieu est réparti en frac-

(*) Manuscrit reçu le 20 octobre 1959.

(1) On peut considérer ici comme fixé tout le P trouvé sur les bactéries après lavage. Ce terme a été introduit par Bonét-Maury dans ses travaux antérieurs.

tions de 10 ml dans des tubes de 22 mm de diamètre, de façon à avoir une grande surface par rapport au niveau du liquide.

Avec un faible ensemencement au départ (1 000 à 5 000 bactéries par millilitre) la multiplication bactérienne peut atteindre des dizaines de milliers de fois le titre initial. Dans les conditions de l'expérience, nous obtenons environ $2 \cdot 10^8$ bactéries par millilitre en vingt heures et $3 \cdot 10^8$ bactéries par millilitre en quarante heures de croissance. Une telle augmentation permet d'envisager que tous les éléments de la culture se sont développés en présence du phosphore. L'intensité de la multiplication est déterminée par la méthode des dilutions et l'ensemencement sur plaques à 1,5 p. 100 de gélose.

Les bactéries sont tuées, soit par chauffage à 60°C pendant une heure, soit à 100°C pendant quinze minutes. Les épreuves de survie sont faites sur plaques de gélose et en bouillon.

La stabilisation de la croissance pendant une heure est réalisée à $48^\circ\text{--}49^\circ\text{C}$. A cette température, la culture reste vivante sans que le nombre des germes augmente d'une façon appréciable par nos techniques de titrage. Bien entendu, la possibilité de multiplication de certaines bactéries, surtout dans les cultures très jeunes, n'est pas exclue, mais dans nos expériences la fixation du phosphore ne dure qu'une heure.

L'étude de la fixation est toujours faite sur 40 ml de culture, répartie par fractions aliquotes de 10 ml dans quatre tubes, à laquelle est ajouté le phosphore, soit au début du développement, soit après le chauffage ou stabilisation de la culture.

Le radiophosphore minéral marqué, sans entraîneur, nous est fourni par le Commissariat à l'Energie Atomique sous forme d'acide phosphorique ($^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$). Avant l'expérience, la préparation est neutralisée avec de la lessive de soude à 1 : 20 et chauffée une heure à 60°C . La quantité de radioélément introduite dans une culture au cours de nos recherches varie, d'une expérience à l'autre, de 1 à 20 μc par millilitre de milieu. Nous avons rarement utilisé de plus grandes quantités (25 à 70 μc). La culture se développe normalement à condition que la radioactivité du milieu ne dépasse pas 0,1 à 0,2 millicuries par millilitre. Avec 1 mc par millilitre, la croissance bactérienne, dans une solution de peptone à 1 : 1 000, est retardée et moins intense.

L'introduction dans le milieu de phosphore, radioactif ou non, ne stimule pas la croissance bactérienne. Des quantités plus grandes de phosphore, même non radioactif, inhibent cette croissance.

La fixation du phosphore introduit dans une culture en voie de multiplication se poursuit au cours de son développement pendant vingt à quarante heures et, dans certaines expériences, continue jusqu'à six jours. Dans les cultures témoins (chauffées

ou stabilisées) cultivées en même temps, le contact des bactéries avec ^{32}P ne dure qu'une heure à 48°-49° C.

Les cultures non témoins sont chauffées ensuite à 60°, afin que toutes les bactéries soient mises dans les mêmes conditions au moment du lavage. On pratique quatre lavages rapides avec du phosphate à 3 p. 100 (pH = 7). Après le dernier lavage, les dépôts bactériens sont repris avec de l'eau distillée, de façon à avoir 1.10^8 bactéries par millilitre et chaque suspension est ensuite desséchée en trois coupelles d'aluminium, avec 0,5 cm³ par coupelle. On prend comme résultat la moyenne de trois mesures. Dans certaines expériences, les restes de dépôt sont ensuite traités par l'acide trichloracétique à 5 p. 100 pendant vingt heures à 20° C. Après la définition de leur turbidité, la radio-activité de chaque dépôt est aussi mesurée en trois coupelles avec 0,5 ml du dépôt par coupelle.

RÉSULTATS.

Dans nos expériences, la quantité de phosphore fixée par les bactéries varie selon que les germes sont tués ou vivants. Avec une concentration différente du ^{32}P au départ, le pourcentage de fixation a été de 1 à 19 p. 100 pour les bactéries en croissance, de 0,2 à 7 p. 100 pour les bactéries à l'état stationnaire, et de 0,02 à 8 p. 100 pour les bactéries tuées. Dans la plupart des cas, la fixation de phosphore est plus intense par les bactéries vivantes que par les bactéries tuées, par les bactéries en voie de développement que par celles d'une culture stationnaire. Cependant, on constate une grande variabilité dans la quantité du ^{32}P retenu par les bactéries tuées, contrairement à ce que l'on observe avec les germes vivants. De ce fait, la proportion du ^{32}P fixé par les germes tués peut être si élevée qu'elle se rapproche beaucoup de celle fixée par les bactéries vivantes (tableau I).

La grande variation observée dans la proportion du phosphore fixée par les bactéries tuées ne s'explique ni par la quantité du P introduite dans les cultures, ni par sa désintégration. Certaines préparations de ^{32}P se fixent mieux que d'autres sur les bactéries tuées. Si par exemple le ^{32}P du 7 avril 1959 est retenu en quantité relativement faible, ce n'est pas le cas pour le ^{32}P du 10 février 1959, pour lequel on constate une fixation presque identique par les bactéries vivantes et les bactéries tuées (tableau II). Nous ne voulons pas impliquer de ce fait la responsabilité des échantillons de ^{32}P utilisés dans nos expériences. D'autres facteurs peuvent intervenir, qui sont liés indirectement à la préparation.

Nous avons étudié quelques facteurs pouvant déterminer la marche de la fixation du phosphore par les bactéries. La durée

TABLEAU I. — Fixation comparée du ^{32}P par les bactéries vivantes et tuées.

Expérience	État des bactéries		
	Encroissance	Stationnaires	Tuées
I	1,5	1	0,5
II	5	5	3
III	7	6	5
IV	8	0,8	0,02
V	8	0,8	0,04
VI	10	1	0,07
VII	10	2	0,2
VIII	13	0,9	0,04
IX	14	3	5
X	15	2	0,15
XI	17	7	5
XII	19	6	8

Le pourcentage de ^{32}P fixé varie davantage chez les bactéries tuées que chez les bactéries vivantes.

du contact des bactéries avec le phosphore n'influence pas notablement l'intensité de la fixation. Celle-ci, toujours très rapide, se manifeste dès les premiers moments et n'augmente pas les heures suivantes. Nous avons eu, par exemple, une fixation de 3 p. 100 après quinze minutes et ensuite, toujours de 7 p. 100 après trente minutes, soixante minutes et vingt-quatre heures de contact. L'âge des bactéries ne semble pas intervenir de façon directe dans le phénomène ; en général, la fixation du P se produit aussi bien avec les bactéries de vingt-quatre heures qu'avec celles de six jours. Les bactéries chauffées à 60° C et à 100° C fixent le P à peu près de la même façon (tableau III).

Pourtant, dans des conditions d'expérimentation rigoureusement identiques, il existe deux facteurs en fonction desquels la fixation varie également chez les bactéries vivantes et chez les bactéries tuées : c'est la concentration du milieu en phosphore et le nombre de germes au début de l'expérience. Plus la concentration du milieu en P est grande, plus la fixation de celui-ci est intense (fig. 1, A et B). Moins il y a de bactéries au moment de la fixation, plus grande sera la quantité de P retenue par ces bactéries

TABLEAU II. — Fixation de différents échantillons de ^{32}P par les bactéries vivantes et tuées.

Échantillons de ^{32}P	Bactéries		Rapport
	Vivantes	Tuées	
^{32}P de 15-4-58	1	0,005	1/200
" " " " "	2	0,13	1/15
^{32}P de 6-5-58		0,008	1/200
^{32}P de 8-11-58	8	1	1/8
" " " " "	10	1,6	1/7
" " " " "	10	1,7	1/6
^{32}P de 6-1-59	5	5	1/1
" " " " "	6	6	1/1
" " " " "	10	8	1/1
^{32}P de 20-1-59	3	0,3	1/10
" " " " "	10	1,0	1/10
^{32}P de 10-2-59	7	2	1/3
" " " " "	7	5	1/2
" " " " "	10	0,2	1/50
" " " " "	4	5	1/3
" " " " "	17	5	1/3
" " " " "	19	8	1/2
^{32}P de 7-4-59	8	0,02	1/400
" " " " "	8	0,04	1/200
" " " " "	10	0,07	1/140
" " " " "	13	0,04	1/300
" " " " "	3	0,04	1/300
" " " " "	5	0,15	1/100
^{32}P de 28-4-59	1,5	0,5	1/3
" " " " "	5	3,0	1/2

Le pourcentage de ^{32}P fixé varie avec les différents échantillons de ^{32}P .

TABLEAU III. — Fixation du ^{32}P sur les bactéries en fonction de l'âge de la culture et de l'état des germes.

État des bactéries	Age des cultures			
	19 h	43 h	72 h	144 h.
En croissance	15	13	8	8
Stationnaires	2	0,8	0,8	0,8
Tuées à 60°C	0,2	0,02	0,02	0,05
Tuées à 100°C	0,2	0,04	0,02	0,04

L'âge des bactéries ne semble pas intervenir directement dans la fixation du ^{32}P (la radioactivité plus grande obtenue avec la culture de 19 heures s'explique certainement par le fait qu'à ce stade, le nombre de germes est inférieur à celui trouvé dans les cultures plus âgées). La fixation du ^{32}P sur les bactéries chauffées à 60° et à 100° C se fait avec la même intensité (en pourcentage).

(fig. 1, C). Ces observations ont toujours été faites dans les conditions d'une même expérience, pour éviter certaines variations inévitables dans des expériences séparées. Notamment l'emploi de différentes préparations de ^{32}P peut changer, d'une expérience à l'autre, le pourcentage de P fixé par un nombre de germes et à concentration égale de P.

La fixation plus intense du radiophosphore par des bactéries, lorsqu'on utilise de fortes concentrations de ce radioélément, a déjà été signalée par Bonét-Maury et Deysine (1953), Tubiana (1953) et Korn (1955). Guelin et Lépine (1957) ont observé un

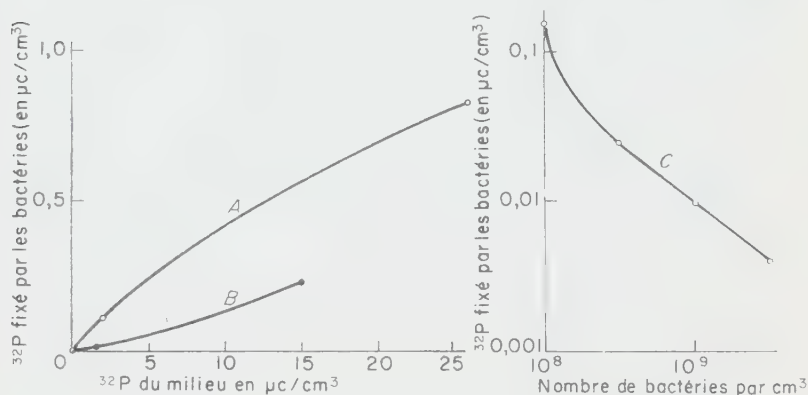


FIG. 1. — Fixation du radiophosphore par les bactéries en croissance (A) et les bactéries tuées (B) en fonction de la concentration de phosphore et du nombre de germes (C). La fixation du ^{32}P , en pourcentage, par les bactéries est plus intense avec une concentration élevée de P (A et B) et un nombre de germes plus petit (C).

phénomène du même ordre au cours de recherches avec du sodium radioactif. Trochine (1948) a développé et appliqué aux levures une formule relative à la distribution des ions en fonction de leur concentration dans le milieu.

TABLEAU IV. — Quantité de ^{32}P retenue par les bactéries après leur lavage par des solutions de phosphates et de chlorure de sodium.

A				B			
Phosphates	2	heures à	20°C — 8	Phosphates	20	heures à	40°C — 4
Chlorure de sodium	2	"	" 20°C — 10	"	20	"	" 20°C — 8
" " "	20	"	" 20°C — 10	Chlorure de sodium	20	"	" 40°C — 5,5
" " "	20	"	" 40°C — 8	" " "	20	"	" 20°C — 10

Une température élevée est favorable à la libération du phosphore fixé. L'emploi de phosphates améliore légèrement cette libération (en pourcentage).

En ce qui concerne la fixation de ^{32}P dans ses rapports avec le nombre de germes, il n'y a pas, à notre connaissance, d'indications bibliographiques à ce sujet. La diminution inexplicable de radioactivité observée par Korn (1955) dans des cultures riches peut probablement être mise au compte de ce phénomène.

Nous avons cherché à améliorer la technique de lavage des germes avant de mesurer leur radioactivité. Le lavage avec des solutions de phosphates (Labaw, Mosley et Wyckoff, 1950) libère un peu plus de phosphore que celui avec l'eau physiologique, surtout à température élevée (tableau IV). Le traitement des bactéries par l'acide trichloracétique à 5 p. 100 stimule davantage la libération du phosphore retenu par ces bactéries et spécialement dans le cas des germes vivants (tableau V).

TABLEAU V. — Quantité de ^{32}P retenue par les bactéries avant et après leur traitement par l'acide trichloracétique.

État des bactéries	Échantillons de ^{32}P						
	du 7-4-59			du 10-2-59		du 28-4-59	
En croissance	4 -0,8	13 -0,6	6 -0,5	14-1	17-1	1,5-1	
Stationnaires	0,2 -0,04	0,1 -0,08	0,6 -0,06	3-0,6	7-0,7	1 -0,5	
Tuées à 60°C	0,06-0,02	0,05-0,01	0,08-0,01	5-0,6	5-0,7	0,5-0,5	
Tuées à 100°C	0,06-0,04	0,06-0,01	0,08-0,02	2-0,6	5-0,7	0,7-0,5	

Le traitement des bactéries par l'acide trichloracétique (chiffres italiques) libère davantage de ^{32}P fixé, surtout chez les germes vivants (en pourcentage).

DISCUSSION.

Ainsi, les bactéries en voie de multiplication en présence de phosphore retiennent cet élément jusqu'à des centaines de fois plus que ne le font les bactéries tuées. Ce fait pourrait être considéré comme preuve de l'assimilation du radiophosphore trouvé sur les bactéries vivantes. Cependant, la quantité de ^{32}P retenue par les germes tués varie dans de telles limites que parfois elle ne diffère pas beaucoup de celle enregistrée chez les bactéries vivantes. Le traitement des bactéries par l'acide trichloracétique devrait théoriquement enlever tout le phosphore non assimilé. Une partie du ^{32}P fixé est, en effet, libérée après ce traitement, mais on n'a jamais constaté la disparition de la radioactivité des bactéries tuées. Comme ce sont surtout les germes vivants qui, dans ces conditions, libèrent leur phosphore, la différence entre la quantité du ^{32}P fixée par les bactéries vivantes et tuées devient encore moins grande.

Du moment que le phosphore peut être retenu de façon stable par les bactéries tuées, sa présence chez les bactéries vivantes

ne peut pas être considérée comme due exclusivement à une assimilation. En dehors d'une assimilation, il devrait y avoir d'autre forme de liaison de P avec les cellules bactériennes vivantes, la même probablement qui se manifeste dans le cas des germes tués. Cette liaison pourrait être plus intense dans le cas de croissance bactérienne, plus restreinte après dénaturation des bactéries par la température.

Les résultats de nos recherches sur la fixation du phosphore en fonction du nombre des germes et, surtout, en fonction de sa concentration dans le milieu suggèrent la possibilité d'une fixation non métabolique du P par les bactéries. Nous avons observé la fixation du radiophosphore au cours d'une multiplication bactérienne de cent mille fois environ. Cette fixation s'est révélée en rapport direct avec la quantité de phosphore introduite dans le milieu. Avec 70 μc , 7 μc , 0,7 μc et 0,07 μc par centimètre cube de milieu, nous avons enregistré une radioactivité des bactéries de 4 μc , 0,6 μc , 0,03 μc , 0,006 μc avec 10^8 bactéries par centimètre cube. Ces résultats ne parlent pas en faveur d'une assimilation exclusive du phosphore. Il est peu probable qu'une assimilation ait été conditionnée, non pas par les besoins des bactéries en phosphore, mais uniquement par sa concentration dans le milieu, et qu'elle puisse s'accroître plus de mille fois du fait que les bactéries disposent d'une quantité plus grande de cet élément.

Bien que la fixation stable et non métabolique du ^{32}P par les bactéries tuées nous fasse supposer la possibilité d'une telle fixation aussi chez les bactéries vivantes, il serait délicat de chercher à établir le taux du phosphore assimilé par comparaison avec sa fixation chez le témoin. Même en dehors de l'assimilation, la fixation de P par les germes tués n'est pas tout à fait comparable à celle constatée chez les germes vivants. Certains facteurs peuvent favoriser la fixation de P dans une culture en croissance. Les jeunes bactéries sont plus volumineuses et possèdent une surface plus développée que les bactéries adultes. Les parois bactériennes, qui, à l'échelle moléculaire, ne présentent pas de surfaces géométriques, sont probablement plus sinueuses chez les bactéries très jeunes. Tout ceci entraîne un accroissement de la surface générale des microorganismes, favorisant ainsi la fixation du phosphore par des germes en multiplication.

D'autre part, les cultures jeunes contiennent au départ peu de bactéries, tout en présentant un développement ralenti à cause de la pauvreté du milieu. Or, nous avons déjà signalé la fixation plus intense du phosphore en présence d'un faible nombre de germes. On devrait donc s'attendre à ce que la quantité de phosphore retenue par la culture très jeune soit plus grande que celle observée dans la culture après sa croissance. Malgré les conditions favorables à la fixation du phosphore par les bactéries en proli-

fération, elles en retiennent parfois une quantité voisine de celle retenue en une heure par les bactéries tuées ou stabilisées.

La fixation du ^{32}P par les bactéries tuées, constatée même après leur traitement par l'acide trichloracétique, n'est pas entièrement explicable pour le moment. S'agit-il seulement d'une adsorption à la surface bactérienne, ou, également, d'une fixation sur le stroma cellulaire après la diffusion des ions ^{32}P à travers les parois bactériennes ? L'échange d'ions pourrait être activé dans le cas des bactéries chauffées. C'est ainsi que Trochine (1956), d'après les travaux de Nassonov et Alexandrov (1943) et ceux d'autres auteurs, signale une perte en phosphates dans les cas de protoplasme lésé et leur transformation en une forme ionisée, facilement diffusable. Le radiophosphore, dans nos expériences, est peut-être entraîné par échange dans les couches profondes de la cellule bactérienne, devenant ainsi difficilement accessible au lavage et à l'action de l'acide trichloracétique. Il est évident, comme le remarque Dervichian (1955), que beaucoup de phénomènes, qui peuvent avoir pour siège l'intérieur d'un organisme ou le milieu dans lequel il baigne, ne sont imputables qu'à de simples facteurs physico-chimiques.

Nous ignorons également la cause des grandes variations observées dans la quantité du phosphore fixé par les bactéries tuées. Les recherches en cours apporteront, espérons-le, une explication valable. Quoi qu'il en soit, la possibilité d'une fixation stable et non métabolique du phosphore par les bactéries existe. Elle pourrait devenir une cause d'erreur dans l'interprétation des résultats au cours de recherches sur les bactéries et les bactériophages marqués par ^{32}P . Dans des conditions expérimentales identiques, une fixation intense du ^{32}P , observée également chez les germes tués, donne à penser que le phosphore considéré comme assimilé serait en réalité en quantité moins importante que ne l'indiquent les résultats de l'enregistrement. Pour certaines recherches, l'étude parallèle avec des bactéries témoins serait à envisager.

CONCLUSION.

Au cours d'études sur le métabolisme de *Shigella dysenteriae* Y 6R, la question s'est posée de savoir si le ^{32}P décelé dans les bactéries après leur multiplication en présence de cet élément devait être entièrement mis au compte d'une assimilation du P par les bactéries.

Il semble bien que l'assimilation par les bactéries de ^{32}P minéral, même si elle a lieu, doit être plus limitée qu'on ne le croit généralement, et qu'une partie au moins du ^{32}P soit simplement fixée par les bactéries.

SUMMARY

COMPARATIVE FIXATION OF P^{32} BY LIVING
BACTERIA AND BY KILLED BACTERIA.

In the course of studies on *Shigella dysenteriae* Y6R metabolism, the origin of the P^{32} demonstrated in bacteria after multiplication in presence of P^{32} has been discussed : is this phosphorus entirely due to an assimilation by the bacteria ?

The authors' experiments suggest that the assimilation of mineral P^{32} is more limited than is generally thought and that a part at least of the P^{32} is only fixed on the bacteria.

BIBLIOGRAPHIE

- BONÉT-MAURY (P.) et DEYSINE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 1052.
DERVICHIAN (D. G.). In *Problèmes de structures, d'ultrastructures et de fonctions cellulaires* de J. André Thomas, Masson, Paris, 1955, 135.
GUELIN (A.) et LÉPINE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 719.
KORN (M. J.). In *Travaux sur l'application des isotopes radioactifs en médecine*. Medguiz, Moscou, 1955, 132.
LABAW (L. V.), MOSLEY (V. M.) et WYCKOFF (R. W. G.). *J. Bact.*, 1950, **59**, 251.
NASSONOV (D. N.) et ALEXANDROV (V. J.). *Ouspekhi sovrem. biol.*, 1943, **16**, 577.
ROTHSTEIN (A.). *Conférence Internationale sur les radioisotopes dans la recherche scientifique*, Paris, 1957.
STERNBERG (J.) et PODOSKI (M. O.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 853.
STERNBERG (J.) et FRAPPIER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **90**, 36.
TROCHINE (A. S.). *Biochimia*, 1948, **13**, 253.
TROCHINE (A. S.). *Problème de la perméabilité cellulaire*, édit. Acad. Sci. URSS, 1956, 305.
-

ÉTUDE DES HÉMOLYSATS DES GLOBULES ROUGES HUMAINS

II. PRÉSENCE DANS LES SÉRUMS NORMAUX D'UNE SUBSTANCE PRÉCIPITANT L'HÉMOLYSAT

par F. PEETOOM, N. ROSE, S. RUDDY, A. MICHELI et P. GRABAR (*).

(Institut Pasteur, Service de Chimie microbienne)

Comme nous l'avons mentionné dans le premier article de cette série [41], on observe une bande de précipitation lorsqu'on fait diffuser dans un gel de gélose un hémolysat et un sérum, même normal, de lapin. L'étude de ce phénomène est décrite dans le présent mémoire.

MÉTHODES ET MATÉRIEL.

Les méthodes immunologiques et le matériel utilisés dans ce travail ont été les mêmes que ceux déjà décrits dans le premier mémoire [41].

RÉSULTATS.

Dès les premiers essais que nous avons réalisés pour contrôler l'efficacité des lavages des érythrocytes, nous avons constaté, en recherchant la présence de constituants sériques dans les hémolysats à l'aide d'un immunsérum équin anti-sérum humain normal (sérum n° 282), qu'en utilisant la technique d'Ouchterlony de double diffusion en milieu gélifié ou l'analyse immuno-électro-

(*) Manuscrit reçu le 24 juillet 1959.

LÉGENDE DE LA PLANCHE I.

FIG. 1. — Deux séries comparatives de plaques d'Ouchterlony dans lesquelles on fait varier : *a*) la concentration saline et *b*) le pH. Dans le réservoir central : hémolysat (Hem/c). Sur chaque plaque, un système SHN-sérum 282 anti-SHN montrant l'influence des variations de concentrations en NaCl et de pH sur la précipitation non spécifique d'une part, et sur un système spécifique, d'autre part.

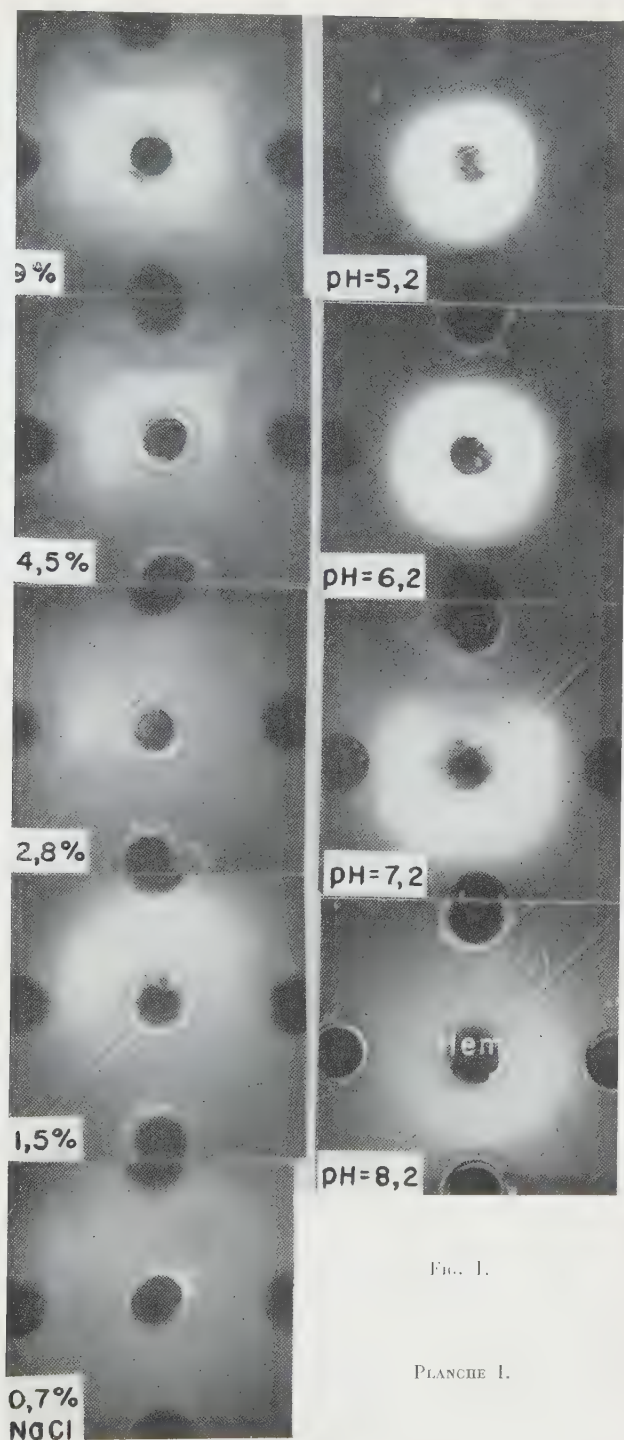


FIG. 1.

PLANCHE I.

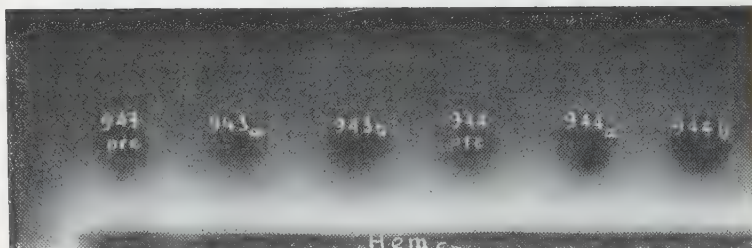


FIG. 2. — Sérum du lapin 943 avant immunisation (943 *pré*), en début d'immunisation (943 *a*) et en fin d'immunisation (943 *b*). *Idem* pour le lapin 944. Précipitation non spécifique entre ces sérums et l'hémolysat complet (Hém/c).

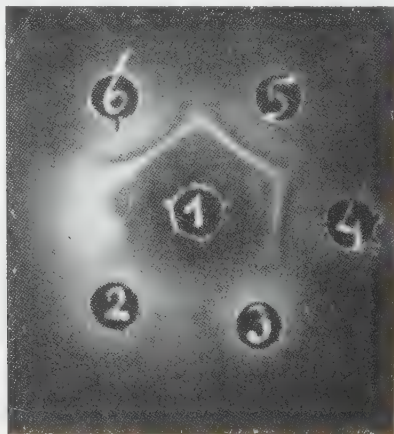


FIG. 3. — 1 : Hém/c. 2 : urine normale. 3 : sang de cordon. 4 : sérum humain normal. 5 : Hodgkin (1). 6 : Hodgkin (2). Agar 1,2 p. 100, NaCl 4,5 p. 100, pH 5,5.

PLANCHE II.

phorétique on observe la formation d'une bande de précipitation dans le gel de gélose. Ce précipité se forme à la limite de la zone de diffusion de l'hémoglobine (fig. 1 a); la bande est assez fine et de densité relativement faible. Lorsqu'on arrive à éliminer la majeure partie de l'excès de l'hémoglobine de la gélose, en effectuant de nombreux lavages, le précipité paraît blanc, mais il se colore facilement par l'amidoschwarz, après séchage de la gélose et par les méthodes que nous utilisons habituellement pour

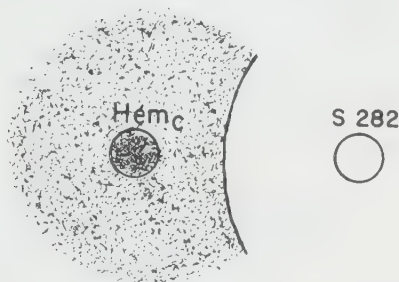


FIG. 1 a. — Hém/c = Hémolysat complet. S 282 = sérum équin anti-sérum humain normal.

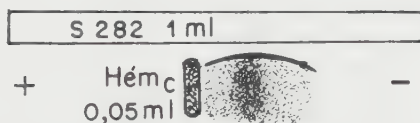


FIG. 1 b. — Electrophorèse d'un hémolysat complet (Hém/c 0,05 ml) diffusant contre un sérum équin anti-sérum humain normal (282).

la coloration des précipités antigène-anticorps [12]. La réaction des peroxydases selon Uriel [13] ne donne pas la coloration bleue des précipités spécifiques d'hémoglobine, mais tout au plus une teinte brun violacé comme la zone de diffusion de l'hémolysat. Dans l'analyse immuno-électrophorétique, cette ligne de précipitation est située dans la zone des mobilités des globulines β et comme précédemment à la limite de la tache colorée formée par l'hémoglobine (fig. 1 b). Ayant cru d'abord que cette précipitation était due à la présence dans les hémolysats d'une β -globuline sérique, nous avons tenté, en vain, de l'éliminer en utilisant pour le lavage des érythrocytes des liquides variés (solution saline physiologique, liquide de Hanks, solution tampon de phosphates ou de véronal). L'hypothèse selon laquelle il s'agit d'une fixation

ou d'une adsorption spécifique d'une globuline β par les érythrocytes a pu être exclue car :

a) La technique d'Ouchterlony permet de montrer que cette ligne de précipitation ne rejoint aucune des lignes de précipitation formées par du sérum humain normal et l'immunsérum n° 282 (fig. 2) ;

b) Un hémolysat préparé à partir de globules rouges d'un nouveau-né, dont le sérum ne contient pas de globulines β_2 , forme cependant la même ligne de précipitation que l'hémolysat d'érythrocytes d'un adulte ;

c) Des expériences de contrôle ont permis de constater que

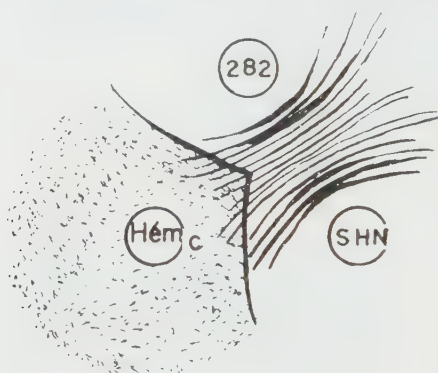


FIG. 2. — Sérum humain normal (SHN) révélé par un sérum de cheval anti-sérum humain normal (282) et réagissant l'un et l'autre perpendiculairement avec un hémolysat (Hém/c).

cette bande de précipitation est formée même lorsqu'on remplace l'immunsérum anti-sérum humain par un sérum normal, humain ou de lapin (fig. 2).

Dans une autre série d'expériences, nous avons pu nous rendre compte que cette précipitation est indépendante des groupes sanguins, car des hémolysats et des sérums de sujets appartenant à des groupes différents ont donné des résultats identiques. Enfin nous avons, à notre étonnement, constaté que le sérum d'un sujet donnait cette ligne de précipitation avec l'hémolysat de ses propres érythrocytes. Cette constatation nous oblige à admettre que la précipitation observée ne doit pas être classée comme une réaction de nature immunologique.

Pour préciser les conditions optima de cette réaction, des essais ont été réalisés dans lesquels on faisait varier d'une part la concentration saline, et d'autre part le pH. La fig. 1, pl. I, repré-

sente quelques-uns des résultats de la série de ces essais ; la plus forte précipitation a été observée lorsque la concentration en NaCl a été de 4,5 p. 100 et le pH inférieur ou égal à 6,2. Tandis que ces essais de contrôle, effectués simultanément sur les mêmes plaques de gélose, donc dans les mêmes conditions, ont permis de confirmer le fait connu que les réactions de précipitation spécifique (les essais ont été réalisés avec l'immunsérum n° 282 anti-sérum humain normal et un sérum humain normal) sont le plus prononcées à un pH compris entre 7,2 et 8, et à une concentration en NaCl de 0,7 à 0,9 p. 100.

La précipitation observée n'étant pas de nature immunologique,

TABLEAU I. — Réactions spécifiques non-immunologiques entre l'hémolysat et des sérums différents ou des fractions sériques.

<u>REACTIONS SPECIFIQUES NON-IMMUNOLOGIQUES ENTRE L'HÉMOLYSAT ET DES</u> <u>SÉRUMS DIFFÉRENTS ET DES FRACTIONS SÉRIQUES.</u>	
Hem/c avec :	.
Sérum humain normal	+
Sérum de Hodgkin	++
Sérum de cordon	(+)
Sérum de Lapin N	+
Sérum de lapin anti-Hem/c	+ (plus fort que sérum de Lapin N)
Sérum de cheval anti-humain 282	+
Sérum de cheval N	+
Sérum de cheval anti-humain 1299	+
Solution de protéines plasmatiques pasteurisées	+
Solution de protéines urinaires concentrées	(+)
Liquide céphalo-rachidien	(+)
Albumine humaine	- (éventuellement + avec methémoglobine)
α_2 -Macroglobuline	-
Plusieurs fractions IV	- (à pH 8,2)
Lipoprotéines (α_2)	-
Sidérophiline	-
Haptoglobine (un type)	-

+ = positif ; ++ = fortement positif ; (+) = faiblement positif ; - = négatif.

nous avons essayé de définir les substances qui en sont la cause. Le tableau I montre que tous les sérums essayés, provenant de diverses espèces animales, ainsi que le sérum provenant du cordon, contiennent la substance sérique qui précipite l'hémolysat. Cependant, aucune des diverses fractions des protéines sériques, purifiées par la méthode de l'alcool, dont nous possédons des échantillons, n'a permis d'obtenir une précipitation dans les mêmes conditions.

L'analyse électrophorétique du sérum humain en gélose, développée à l'aide d'un hémolysat, a permis de constater que le facteur sérique migre dans la zone des α_2 -globulines. Le facteur présent dans le sérum de lapin normal résiste à un court chauffage inférieur à 70° C et même à une pasteurisation à 60° C pendant dix heures dans le sérum humain normal ; il est neutralisé par l'addition au sérum d'une petite quantité d'hémolysat (Hem/c) ou d'extraits de foie, de rein ou de rate humains. Ces extraits, toutefois, sont contaminés par du sang. L'absorption du sérum par des érythrocytes intacts ou par des stromas bien lavés ne supprime pas le facteur sérique, ni ne diminue son activité précipitante. Nous avons constaté que la précipitation se fait aussi bien avec le plasma qu'avec le sérum après défibrinisation.

Par la coloration au Soudan noir, combinée avec les colorations habituelles, on observe une distinction nette entre les lipoprotéines et le précipité non spécifique : elles ne sont donc pas en cause.

Il est intéressant de noter que le précipité qui se forme si nettement en milieu gélifié ne semble pas facile à obtenir en milieu liquide. Dans des essais, faits soit en milieu salin isotonique, soit à une concentration de 4,5 p. 100 de NaCl et en présence d'un tampon de pH 6,2, nous n'avons pu obtenir que des quantités minimales d'un précipité blanc ; nous n'avons pas persévéré dans ces tentatives.

Il semble que la quantité du facteur sérique précipitant augmente au cours de l'immunisation chez le lapin. En effet, comme le montre la fig. 2, pl. II, lorsqu'on compare, d'après leur diamètre, les anneaux de précipitation que forment les sérums dans une épreuve en milieu gélifié, avec un hémolysat, on voit que les sérums prélevés chez le même lapin au cours de l'immunisation réagissent plus fortement que le sérum prélevé avant l'immunisation.

Nous avons disposé circulairement sur une plaque d'Ouchterlony, autour d'un réservoir d'hémolysat, de l'urine normale, du sang de cordon, du sérum humain normal et deux sérums de sujets atteints de maladie de Hodgkin (fig. 3, pl. II). On constate qu'une précipitation non spécifique se forme : abondamment en face des sérums de Hodgkin, notablement en face du sérum normal.

faiblement avec le sérum fœtal et pratiquement pas avec l'urine. Celle-ci, à l'état normal, selon les auteurs, contient [10] ou ne contient pas [2] l'haptoglobine.

Nous avons étudié également la substance précipitante de l'hémolysat. Elle reste dans le surnageant lorsqu'on précipite l'hémolysat par du sulfate d'ammonium 2,0 M, mais elle est éliminée ou détruite par de l'acide trichloracétique à 5 p. 100. Lorsqu'on soumet l'hémolysat à l'analyse électrophorétique en gélose et qu'on utilise un sérum normal pour effectuer la précipitation, la bande se forme dans la zone de migration de l'hémoglobine (fig. 1 b). De même dans l'épreuve d'après Ouchterlony, la bande de précipité coïncide avec la zone de diffusion de l'hémoglobine et semble même la limiter (fig. 1 a). Cependant, il serait difficile d'admettre d'emblée que c'est l'hémoglobine qui est précipitée, puisque : a) la ligne de précipitation paraît non colorée lorsqu'on lave convenablement les plaques de gélose à la fin de la réaction, et b) on arrive à obtenir une séparation entre la ligne de précipité et la tache formée par l'hémoglobine. La fig. 1, pl. I, reproduit une expérience dans laquelle la diffusion de l'hémoglobine a été retardée par l'abaissement du pH ; dans ces conditions, le précipité s'est formé à la même distance de sa source que dans l'expérience témoin, mais en avant de la zone colorée par l'hémoglobine. Cette dernière semble retardée dans sa diffusion à pH 5,2 ou 6,2 tandis que le facteur précipitant ne le serait pas.

DISCUSSION.

Nos expériences ont montré qu'une ligne de précipitation se forme en milieu gélifié lorsqu'on fait réagir un hémolysat avec tous les sérums, même normaux, humains ou de divers animaux. La réaction semble s'intensifier quelque peu au cours de l'immunisation du lapin par Hem/c. Le sérum et le Hem/c du même individu donnant la réaction, il ne s'agit pas d'antigènes des groupes sanguins.

La réaction est en étroite relation avec l'hémoglobine, puisque la bande de précipitation est située à la limite de la zone de diffusion de ce constituant coloré. Cependant, en abaissant le pH du milieu gélifié, on arrive à séparer la zone colorée du précipité qui apparaît blanc. Mais, même dans ce cas, la bande de précipitation semble constituer une barrière pour la progression de l'hémoglobine dans le gel. Des réactions antigène-anticorps ordinaires ne constituent pas d'obstacles de ce genre, ce qui nous fait penser que le constituant précipitant de l'hémolysat, s'il n'est pas l'hémoglobine, doit posséder une affinité particulière avec l'hémoglobine ; la vitesse de migration électrophorétique du constituant précipitant coïncide d'ailleurs avec celle de l'hémoglobine.

Nous avons trouvé que le facteur sérique qui précipite avec l'hémolysat possède les propriétés électrophorétiques des globulines α_2 . Nos résultats ne confirment donc pas ceux de Leonardi, Zerbini et Audolfatto-Zaglia [7], qui ont admis que la réaction s'effectue entre l'hémoglobine et la sérualbumine. Nous serions enclins à penser que le facteur sérique serait l'haptoglobine. En effet, Jayle, qui a mis en évidence cette α -globuline, l'a caractérisée par le fait de sa combinaison avec l'hémoglobine. La réaction en milieu liquide entre l'haptoglobine et l'hémoglobine ne se traduit pas par une précipitation. En analyse immuno-électrophorétique, l'haptoglobine migre dans la zone des globulines α_2 [4]. L'expérience que reproduit la fig. 3, pl. II, montre que, lorsque les α_2 -globulines sont augmentées, comme dans la maladie de Hodgkin, la précipitation non spécifique est aussi plus abondante (et l'on sait qu'une augmentation des α_2 -globulines dans les états inflammatoires concerne essentiellement l'haptoglobine [4]).

Le facteur qui précipite l'hémolysat est certainement différent de « l'anticorps naturel » qui intervient dans le phénomène de Thomsen-Friedenreich [8] ; en effet, le facteur est présent dans le sang du cordon et est identique dans les sérums humain, bovin et de lapin. Il semble cependant que, comme l'agglutinine T, sa concentration augmente pendant l'immunisation. Ce facteur diffère aussi de la cryo-agglutinine ordinaire, puisqu'il n'est pas absorbé du sérum par des érythrocytes, même à froid.

On pourrait se demander si ce facteur précipitant joue un rôle défini *in vivo*. En s'unissant aux produits de dégradation normale des érythrocytes, il serait susceptible de servir de transporteur. On pourrait aussi peut-être comparer son activité à celle d'un auto-anticorps. Dans l'espoir de clarifier cette question, nous avons examiné les sérums de trois sujets atteints d'anémie hémolytique acquise. Les résultats préliminaires semblent indiquer que ces sérums sont plus riches en facteur précipitant que des sérums humains normaux, mais cette augmentation pourrait être aussi une conséquence de l'état d'immunisation dans lequel se trouvent ces malades.

RÉSUMÉ.

1° Le sérum humain normal ou de diverses espèces animales contient une substance qui précipite l'hémolysat d'érythrocytes humains normaux.

2° Cette précipitation est le plus prononcée à un pH plus bas (6,2) et à une concentration en sel plus élevée (environ 4,5 p. 100 NaCl) que le milieu physiologique ordinaire. Elle est facilement visible en milieu gélifié.

3° La mobilité électrophorétique en gélose du facteur sérique précipitant correspond à celle des globulines α_2 ; il est relativement thermostable et sa concentration semble augmenter au cours de l'immunisation des lapins par l'hémolysat. Il n'est pas impossible que ce constituant soit identique à l'haptoglobine.

4° Le constituant de l'hémolysat qui réagit avec le sérum n'est pas précipité par le sulfate d'ammonium à demi-saturation ; il possède une vitesse de migration identique à l'hémoglobine et le précipité se forme à la limite de diffusion de cette dernière. Il semble que la substance responsable de la précipitation soit l'hémoglobine elle-même ou lui soit intimement associée.

SUMMARY

IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON THE HEMOLYSATES OF HUMAN RED BLOOD CELLS.

II. A HEMOLYSATE PRECIPITATING FACTOR IN NORMAL SERA.

1. The normal sera of human and other animal species contain a substance which precipitates hemolysates of normal human erythrocytes.

2. The precipitation was optimal at a lower pH (6.2) and at a higher salt concentration (around 4.5 % NaCl) than physiologic. It is readily visible in agar.

3. The electrophoretic mobility of the serum precipitating factor in agar corresponded to that of the α_2 -globulins ; it was relatively thermostable and its concentration seemed to be increased during the course of immunization of rabbits with the hemolysate. It is possible that this constituent is haptoglobin.

4. The constituent of the hemolysate which reacted with the normal serum was not precipitated upon half saturation with ammonium sulfate ; its electrophoretic mobility was identical to that of hemoglobin and the precipitate formed at the limit of diffusion of the hemoglobin. It appears that the substance responsible for the precipitation is hemoglobin itself or a substance intimately associated with it.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] JAYLE (M.) et coll. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 65 et 1063.
- [2] JAYLE (M.) et BOUSSIER (G.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36**, 959.
- [3] JAYLE (M.) et BOUSSIER (G.). *Exp. Ann. Bioch. Med.*, 1955, 172.
- [4] KORNGOLD (L.), LEEUWEN (G. VAN) et MILLER (D. G.). *Nature*, 1959, **183**, 330.

- [5] LAURELL (C. B.) et NYMAN (M.). *Proc. St. Jan Colloquium*, Bruges, 1957.
 - [6] LAURELL (C. B.). *Clin. Chim. Acta*, 1959, **4**, 79.
 - [7] LEONARDI (P.), ZERBINATO (A.) et AUDOLFATTO-ZAGLIA (G.). *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 1956, **35**, 613.
 - [8] LIND (P.), Mc ARTHUR (N.). *Aust. J. exp. Biol.*, 1947, **25**, 247.
 - [9] NYMAN (M.). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1959, suppl. n° 39, **11**.
 - [10] PATTE (J.-C.), BALDASSARE (G.) et LORET (J.). *Rev. Franç. Et. clin. biol.*, 1958, **9**, 960.
 - [11] ROSE (N.), PEETOM (F.) et MICHELI (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 70.
 - [12] URIEL (J.) et SCHEIDEGGER (J. J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 165.
 - [13] URIEL (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1958, **4**, 277.
-

EFFET COMPARÉ DE L'ADRÉNALINE ET DU « FACTEUR DÉCHAINANT » SUR LES CULTURES DE *WELCHIA PERFRINGENS*

par A. CHAGNON (*) et V. FREDETTE (**).

(Département de Bactériologie, Faculté de Médecine, et Service des Anaérobies, Institut de Microbiologie et d'Hygiène, Université de Montréal, Canada)

Bien connue tant en clinique qu'expérimentalement, l'action favorisante de l'adrénaline dans le déclenchement de la gangrène gazeuse a été rapportée par plusieurs auteurs qui l'ont classée parmi les chocs traumatiques [1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10].

Etant donné, d'autre part, que le facteur déchainant [FD] (1) déclenche l'activité des bacilles lavés qui sont inopérants lorsqu'injectés seuls [5], nous avons cherché à comparer ces deux produits.

Pour ce faire, nous avons d'abord examiné *in vitro* leur influence sur les cultures de *Welchia perfringens*.

TECHNIQUE.

La technique à laquelle nous avons eu recours est à la fois simple et rapide : elle consiste en l'addition aseptique de solution d'adrénaline ou de filtrat (FD) à du bouillon Vf contenu dans des tubes de 14×200 mm, ces tubes étant par la suiteensemencés comme il est indiqué ci-après.

Nous avons préparé trois séries de trois tubes chacune (tableau I), tous les tubes ayant reçu au préalable chacun 8 cm³ de bouillon Vf à pH 7,8.

Aux tubes de la série I, nous avons ajouté 0,5 cm³ d'une solution aqueuse d'adrénaline fraîchement préparée à 0,2 mg/cm³ ; ceux de la série II reçurent 0,5 cm³ de filtrat (FD) ; enfin les tubes de la série III ne reçurent rien d'autre que le bouillon Vf.

Le volume final a été ajusté à 9 cm³ avec de l'eau physiologique.

Tous les tubes ont alors étéensemencés avec 1 cm³ d'une culture

(*) Cet auteur a bénéficié d'une bourse de l'Office Provincial de Recherches Scientifiques.

(**) Manuscrit reçu le 20 septembre 1959.

(1) Le facteur déchainant est contenu dans le filtrat d'une culture très jeune (quatre à cinq heures) de *W. perfringens*.

TABLEAU I — Effet comparé de l'adrénaline et du facteur déchainant sur les cultures de *W. perfringens*.

	I	II	Contrôle III
Bouillon Vf	8 ml	8 ml	8 ml
Adrénaline	0,5 ml	—	—
Filtrat (FD)	—	0,5 ml	—
Eau salée	0,5 ml	0,5 ml	1 ml
Inoculum	1 ml culture totale diluée au 10 ^e (1%)		

totale de *W. perfringens* (SWG) diluée au 1/10. La culture en bouillon Vf, servant d'inoculum, était âgée de 10 heures.

Les résultats de la série III constituent donc le contrôle permettant de juger de la croissance à partir d'un inoculum équivalent à 1 p. 100.

Après ensemencement, tous les tubes ont été scellés sous vide (deux minutes à 640 mm Hg) ; portés ensuite au bain-marie réglé à 37° C, la croissance y a été suivie par mesure de la turbidité au photo-colorimètre Klett-Summerson à travers l'écran vert (540 mμ). Pour régler l'appareil, chaque série était accompagnée d'un tube témoin de même type, ensemencé dans les mêmes conditions, mais scellé sans faire le vide, et maintenu, d'autre part, dans l'eau glacée pour empêcher la croissance des bactéries.

RÉSULTATS ET DISCUSSION.

Dans les conditions normales, c'est-à-dire à partir d'un inoculum équivalent à 1 p. 100 (fig. 1, courbe A), la croissance est caractérisée d'abord par une phase de latence d'une durée de cinq à six heures ; puis la phase exponentielle s'installe et le maximum de croissance est atteint en huit heures environ : il se situe à 127 unités arbitraires au spectrophotocolorimètre.

L'addition d'adrénaline [solution fraîche] (fig. 1, courbe B) se traduit dès la première demi-heure par une augmentation rapide de la turbidité. Cette élévation turbidimétrique demeure, toutefois, constante pendant tout le reste du temps d'observation.

De même, l'addition de filtrat (fig. 1, courbe C) donne naissance à une augmentation de la turbidité au même taux que l'adrénaline, sauf que, dans ce cas, il n'y a pas de phase subséquente de stabilisation comme on l'observe avec l'addition d'adrénaline (fig. 1, courbe B), la croissance se poursuivant à la même allure que dans le témoin (fig. 1, courbe A).

Cependant, le maximum atteint est d'autant plus élevé par rapport à la culture témoin que l'amplitude du phénomène d'augmentation turbidimétrique du début a été plus marquée ; ainsi, pour une turbidité de 26 unités à la première demi-heure, nous

obtenons un maximum de 158 unités, alors que sans addition de filtrat (FD) le maximum atteint n'est que de 127.

En outre, nous remarquons qu'avec ou sans addition de filtrat (FD), les maximums ne sont pas déplacés dans le temps :

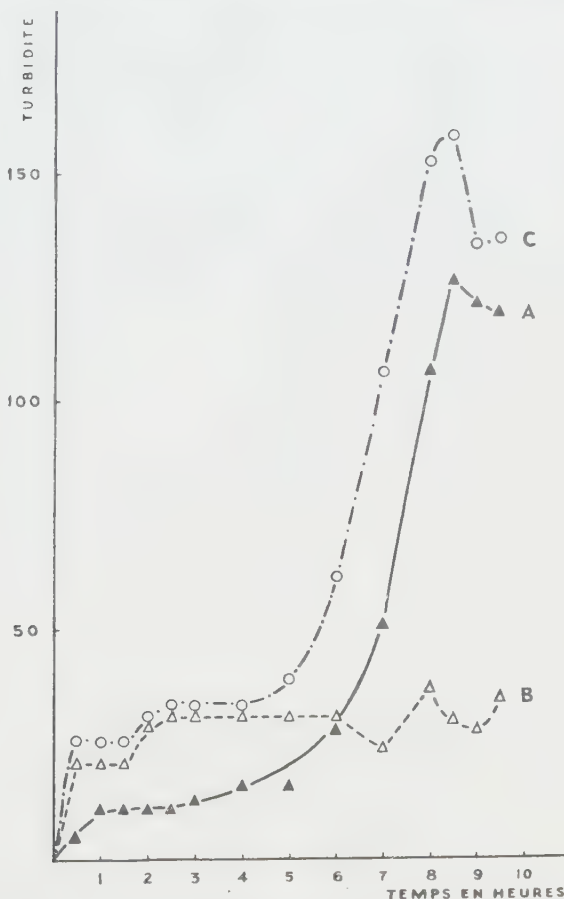


FIG. 1. — Courbe A : Croissance normale de *W. perfringens* en bouillon Vf (témoin), Courbe B : Croissance de *W. perfringens* en bouillon Vf additionné de 0,1 mg d'adrénaline (solution fraîche). Courbe C : Croissance de *W. perfringens* en bouillon Vf additionné de 0,5 cm³ de filtrat (FD).

ils se situent tous les deux à huit heures environ (fig. 1, courbes A et C).

Il semble évident que, dans le filtrat (FD), il y a une activité identique à celle de l'adrénaline sur les cultures de *W. perfrin-*

gens (SWG), du moins pour ce qui regarde l'augmentation turbidimétrique à la première demi-heure de la croissance. La différence réside dans le fait que l'addition de solution fraîche d'adrénaline semble par la suite inhiber la croissance, alors même que l'addition



FIG. 2. — Courbe A : Croissance de *W. perfringens* en bouillon Vf additionné de 0,5 cm³ de bouillon Vf aux lieu et place du filtrat (FD) [témoin]. Courbe B : Croissance de *W. perfringens* en bouillon Vf additionné de 0,1 mg d'adrénaline (solution légèrement oxydée). Courbe C : Croissance de *W. perfringens* en bouillon Vf additionné de 0,5 cm³ de filtrat (FD).

de filtrat (FD) non seulement ne la gêne pas, mais l'accroît davantage que dans la culture témoin.

On pourrait penser que le filtrat brut (FD) apporte un supplément de matières nutritives qui seraient responsables de l'augmen-

tation constatée. Or, les expériences témoins nous ont permis de constater qu'il n'en était rien.

Ainsi l'addition de 0,5 cm³ de bouillon Vf (fig. 2, courbe A) aux lieu et place du filtrat (FD) ne permet pas la manifestation de l'augmentation turbidimétrique obtenue au début de la culture avec l'addition du filtrat (fig. 2, courbe C).

Il est loisible, cependant, de penser que l'addition d'une solution fraîche d'adrénaline (sous forme réduite) peut être la cause de la phase de stabilisation subséquente au phénomène d'augmentation turbidimétrique (fig. 1, courbe C), si l'on considère la possibilité que la solution d'adrénaline demande du temps pour être oxydée, par exemple, dans le milieu de culture.

Nous avons donc fait quelques essais en utilisant une solution d'adrénaline préparée depuis quelques jours, présentant ainsi des signes d'oxydation (coloration rose), aux lieu et place d'une solution fraîchement préparée (ne présentant pas de coloration ou quelque peu rosée).

C'est ce que vérifie la courbe B de la figure 2 obtenue dans ces conditions.

Nous remarquons que l'augmentation turbidimétrique à la première demi-heure est reproduite, suivie d'une courte phase de latence ; puis la phase exponentielle s'installe, de sorte que la courbe prend l'allure de celle obtenue avec l'addition de filtrat (FD) (fig. 2, courbe C).

Les résultats rapportés plus haut ont pu être reproduits sept fois au cours de neuf tentatives comprenant trois lots différents de filtrats (FD) et autant de lots différents de bouillon Vf.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION.

L'emploi de tubes scellés sous vide pour l'étude de l'influence de l'adrénaline et du facteur déchainant (FD) sur les cultures de *W. perfringens* (SWG) a permis de constater pour la première fois *in vitro* que, dans le filtrat (FD) brut, il y a une activité identique à celle de l'adrénaline, manifestée par une augmentation rapide de la turbidité à la première demi-heure de la croissance.

L'addition d'adrénaline, soit sous forme réduite (préparation fraîche), soit sous forme légèrement oxydée (coloration rose), à des cultures de *W. perfringens* en bouillon Vf stimule l'activité cellulaire dès la mise en contact.

Toutefois, seule l'utilisation d'une solution légèrement oxydée d'adrénaline permet de reproduire exactement la courbe de croissance obtenue avec l'addition de filtrat (FD).

Une telle analogie d'action suggère implicitement une analogie de structure entre la portion active présente dans le filtrat (FD) et l'adrénaline : c'est ce que nous cherchons à élucider.

SUMMARY

COMPARATIVE EFFECT OF ADRENALIN AND « BURSTING FACTOR »
ON *Welchia perfringens* CULTURES.

Adrenalin or « Bursting Factor » added to broth seeded with *W. perfringens* (SWG) in tubes sealed under vacuum exert a similar activity in the first half-hour of growth.

The addition of adrenalin in fresh or slightly oxidized solution in Vf broth seeded with *W. perfringens* enhances the cellular activity during the early growth phase.

The identity of action of adrenalin and the active filtrate implicitly suggests an identity of structure.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BROCARD (H.). *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **134**, 567.
 - [2] COOPER (E. V.). *Lancet*, 1946, **1**, 459.
 - [3] DUBOS (R. J.), SMITH (J. M.) et SCHAEGLER (R. W.). *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1955, **48**, 911.
 - [4] EVANS (D. G.), MILES (A. A.) et NIVEN (J. S. F.). *Brit. J. exp. Path.*, 1948, **29**, 20.
 - [5] FREDETTE (V.) et FRAPPIER (A.). *Rev. Canad. Biol.*, 1945, **5**, 436.
 - [6] LAGROT (F.). *Presse méd.*, 1938, **46**, 1657.
 - [7] PALLASSE (E.). *Lyon méd.*, 1936, **158**, 249.
 - [8] RAMOND (L.). *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1943, **58**, 421.
 - [9] RENAUD (M.) et MIGET (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 1052.
 - [10] TOURAINE (A.) et GAUTIER (J.). *J. Méd. Paris*, 1936, **56**, 669.
-

CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE TÉTRACYCLINE

par Lucie SASSINOT et Y. CHABBERT (*).

(*Institut Pasteur, Laboratoire de l'Hôpital*)

Pendant longtemps la fixation tissulaire des antibiotiques a moins retenu l'attention que les concentrations sanguines et le passage à travers les barrières séreuses. Il est cependant courant de constater que l'effet thérapeutique se prolonge au-delà de la présence de taux décelables dans le sang. Dans la staphylococcie rénale de la souris nous avons montré que l'effet bactéricide est proportionnel à la concentration tissulaire, ce qui permettait d'expliquer certaines activités paradoxales de la novobiocine, de la spiramycine et des autres macrolides (Chabbert et coll. [1]).

La comparaison des taux tissulaires dans le groupe des macrolides (érythromycine, carbomycine, spiramycine, oléandomycine) par Pellerat et Maillard [2] et par Bénazet et Dubost [3] montre une fixation particulière de la spiramycine.

Pour les tétracyclines, les études portent principalement sur la chlortétracycline et l'oxytétracycline.

Pour la chlortétracycline, Welch [4] trouve chez le lapin des taux supérieurs aux taux sériques dans le foie, le poumon et la rate, par ordre de concentrations croissantes. Herrell et Heilman [5] observent chez un homme des taux deux à quatre fois supérieurs à ceux du sang dans le foie, la rate et le rein, et égaux dans le poumon.

Pour l'oxytétracycline, Welch [4] retrouve des taux peu différents du sérum pour le foie et le rein et des taux supérieurs ailleurs, mais Santi et Serumbre [6] donnent la prédominance à ces deux organes. Böttinger [7], Helander et Böttinger [8], par une technique particulière d'observation des tissus en fluorescence, insistent sur la fixation particulière dans le S. R. E., le foie et le rein et décrivent un cycle entéro-hépatique.

Tous les auteurs ne sont cependant pas en accord : Pellerat et Maillard [2] chez le cobaye, Pensack et coll. [9] chez le porc, Luther et coll. [10] chez le porc et la volaille et Rusoff et coll. [11] chez le veau, notent l'absence de fixation tissulaire des tétracyclines. Dans ces trois derniers cas, il s'agissait d'antibiotiques

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} octobre 1959.

incorporés dans la nourriture pour stimuler la croissance des animaux à des doses qui sont éloignées des doses utilisées en thérapeutique.

Il nous a semblé intéressant de reprendre chez la souris l'étude de la fixation tissulaire de la tétracycline dans des conditions voisines de celles utilisées pour les macrolides.

TECHNIQUES.

1° CHOIX DES ANIMAUX. — Nous avons utilisé des souris blanches de race CFW de même portée, de même sexe et de même poids (entre 18 et 20 g) pour chaque lot.

Pour l'étude de l'élimination chez le lapin, nous avons utilisé des animaux qui pesaient entre 2 kg et 2,400 kg.

Après traitement, au moment du sacrifice, ces souris sont saignées par ponction du sinus rétro-oculaire (1,5 ml), et les lapins par ponction cardiaque.

Les organes sont prélevés immédiatement après le sacrifice et pesés.

2° TECHNIQUES DE BROUAGE. — Pour obtenir une extraction de la tétracycline aussi complète que possible, nous avons été amenés à comparer les trois méthodes suivantes, sur des foies d'animaux traités par 10 mg *per os* et prélevés deux heures après l'ingestion.

a) *Broyage individuel des organes.* — La technique employée est celle décrite par Chabbert et coll. [4] que nous rappelons ici :

Le dispositif de broyage utilisé est composé d'un tube de verre de 12 × 70 mm, obturé à son extrémité inférieure par un bouchon de caoutchouc n° 1, surmonté d'une petite quantité de sable.

Dans ce tube peut pénétrer une baguette de verre recouverte sur 1 cm à sa partie inférieure d'un manchon de caoutchouc.

Pour broyer, on relie l'extrémité supérieure de la baguette à un agitateur rotatif. A une vitesse moyenne, on obtient en une minute environ un broyat homogène, laissant cependant des placards cellulaires composés de 5 à 10 cellules.

Les fragments d'organes pesés sont introduits dans le tube de verre et on ajoute neuf fois leur poids de solution tampon à pH 4,5. (Nous avons considéré que la densité des organes est voisine de 1 et que la suspension obtenue renferme 1/10 d'organe.)

b) *Broyage aux ultra-sons.* — Nous avons soumis une suspension d'organe à l'action des ultra-sons pendant une heure [960 KHZ, puissance acoustique totale 120 watts] (1). Cette suspension représentait le mélange des broyats séparés, obtenus par la technique précédente, de cinq foies de souris traités par le chlorhydrate de tétracycline.

c) *Broyage et extraction par le méthanol.* — Cinq foies ont été broyés ensemble dans un mortier avec du sable, puis mis en suspension à 10 p. 100 dans une solution comportant 70 p. 100 de méthanol et

(1) Nous remercions M. Prudhomme, qui a bien voulu pratiquer cette étude.

30 p. 100 de solution tampon à pH 4,5. La suspension est filtrée sur entonnoir de Buchner.

Le titrage de ces échantillons montre que le traitement d'un broyat aux ultra-sons qui détruit complètement les cellules ne fait pas apparaître une quantité supérieure de tétracycline.

L'extraction par la solution méthanol et le tampon pH 4,5 ne permet pas non plus d'obtenir une quantité supérieure de produit, par comparaison avec celle donnée par le simple broyat en solution tampon à pH 4,5.

Si les moyennes obtenues sur cinq souris avec ces divers procédés ne

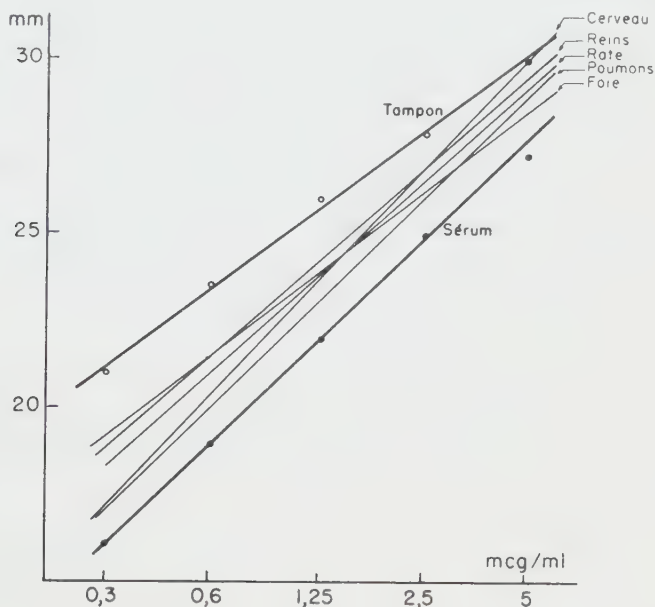


FIG. 1. — Courbes correspondant aux gammes étalon en sérum, tampon et organes.

sont pas significativement différentes, les valeurs individuelles sont très dispersées, montrant des différences importantes de métabolisme d'un animal à l'autre.

En conséquence, nous avons préféré utiliser la méthode de broyage individuel en tube, permettant d'évaluer cette dispersion.

3° TECHNIQUE DE DOSAGE. — Nous avons utilisé la technique de diffusion horizontale en gélose modifiée par Chabbert et Boulingre [12], dont les caractéristiques principales sont les suivantes :

a) Titrage sur une plaque de verre carrée (25 × 25 cm).

b) On coule sur cette plaque une couche de gélose unique et mince (1 mm d'épaisseur de milieu ajusté à pH 5,7 dans le dosage de la tétracycline).

Ce milieu est ensemencé avec 1 ml d'une suspension titrant 6×10^4 spores par millilitre de *Bacillus cereus* ATCC 9634.

c) La source d'antibiotique est représentée par des disques de papier absorbant, immergés dans les solutions à titrer ou les gammes étalons.

Dans le cas présent, les dilutions sont faites avec une solution tampon à pH 4,5 (Grove et Randall [43]).

Ces plaques carrées peuvent recevoir 25 ou 36 disques suivant les titrages, d'où la possibilité de disposer sur la même plaque la gamme étalon répliquée quatre fois et les échantillons à titrer en quatre exemplaires. Tous ces disques étant distribués suivant une randomisation en carré latin.

Les concentrations choisies s'échelonnent de 0,07, 0,15, 0,3, 0,6, 1,25, 2,5 et 5 $\mu\text{g/ml}$ (suivant les taux escomptés on utilise les 5 points de la partie supérieure ou de la partie inférieure de la gamme).

La sensibilité de la méthode permet de titrer 0,1 $\mu\text{g/ml}$ et sa précision est de l'ordre de 10 p. 100.

Choix des gammes étalon. — Dès nos essais préliminaires, il est apparu que si l'on ajoutait à une gamme en tampon pH 4,5 un certain pourcentage d'organes variant de 1 p. 100 à 25 p. 100, on obtenait des zones d'inhibition et une courbe standard qui était différente à la fois de celle déterminée avec une gamme en tampon à pH 4,5 et des gammes en sérum de cheval dilué au 1/2 utilisées pour le dosage de la tétracycline dans le sérum.

Un exemple des résultats obtenus est donné par les courbes correspondant aux différentes gammes (fig. 1).

Les valeurs observées avec les différentes gammes, contenant 10 p. 100 de poumon, cerveau, foie, rate et rein, ne sont pas strictement superposables. On observe au contraire des écarts importants et des variations de pente.

Il est apparu que les meilleures conditions pour effectuer des dosages dans un organe étaient de diluer le broyat de cet organe dans 10 p. 100 de tampon à pH 4,5 et de titrer cet échantillon vis-à-vis d'une gamme étalon comportant 10 p. 100 du même organe en suspension dans du tampon à pH 4,5.

RÉSULTATS.

Les résultats ont été assez différents chez la souris et chez le lapin.

A. SOURIS. — Une certaine accumulation se produisant avec les tétracyclines, les souris ont reçu deux traitements *per os* à vingt-quatre heures d'intervalle, et les dosages ont été faits après le second traitement. Dix lots de 5 souris ont reçu : les 5 premiers 1 mg, soit 50 mg/kg, les 5 suivants 10 mg, soit 500 mg/kg.

L'administration de chlorhydrate de tétracycline, en suspension en eau gélosée à 0,2 p. 100 sous un volume de 0,5 ml, est faite par gavage avec une aiguille courbe.

Après la deuxième ingestion on détermine la concentration sérique et tissulaire à la deuxième, quatrième, huitième, vingt-quatrième et quarante-huitième heure.

La méthode de broyage individuel des organes des animaux que nous avons utilisée permet de se rendre compte de la dispersion des résultats entre les animaux en expérience.

a) *Comparaison des taux obtenus deux heures après ingestion : Avec la dose de 1 mg (50 mg/kg), les taux sériques sont très faibles, en moyenne 0,6 µg/ml.*

Les résultats obtenus avec les différents organes sont exposés dans le tableau I.

TABLEAU I.

Taux moyen en µg/g chez les souris traitées 1mg per os (50mg/kg) Temps après ingestion.

Organes	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Sérum	0,6	0,3	0,1	0	0
Rate	2,4	1	0,4	0,38	0
Foie	5,1	1,8	1	0,3	0
Reins	3,23	1,27	0,58	0,1	0
Poumons	1,2	3,5	0,9	0,16	0
Cerveau	0,49	0,38	0,4	0,09	0

Taux moyen en µg/g chez les souris traitées 10mg per os (500mg/kg) Temps après ingestion.

Organes	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Sérum	2,56	2,8	1,9	0,38	0
Rate	8,9	5,8	3,1	0,9	0,6
Foie	58	47	34,3	0,56	0,3
Reins	29,7	25	8,7	1,3	0,2
Cerveau	2,9	2,6	0,52	0,6	0,1
Poumons	17,6	12,2	5,8	0,35	0,2

Dans le cerveau on observe des concentrations voisines de celles du sérum, assez peu dispersées.

Les taux les plus élevés ont été observés dans le foie et le rein avec une dispersion assez grande : de 1,7 à 7,2 pour le foie et de 1,7 à 5,2 pour le rein.

Dans le poumon, les taux sont à peu près le double de ceux du sang et dans la rate on observe 2,4 µg/g en moyenne, mais avec une forte dispersion de 1,7 à 10,5.

Avec la dose de 10 mg (ce qui correspond chez une souris de 20 g à une dose de 500 mg/kg) les taux sériques ont été cinq fois plus élevés, en moyenne 2,56 µg/ml. Cette concentration est assez voisine des taux rencontrés par Barme et Chabbert [14] chez

l'homme, avec des traitements de l'ordre de 1 g par jour (0,25 g toutes les six heures).

Dans le cerveau, le taux n'est pas significativement différent de celui observé dans le sérum.

Comme précédemment, c'est dans le foie que les concentrations les plus élevées ont été obtenues, variant entre 33 et 90 μg avec une moyenne de 58 $\mu\text{g/g}$.

Dans le rein on observe une moyenne de 29,1 $\mu\text{g/g}$ assez peu

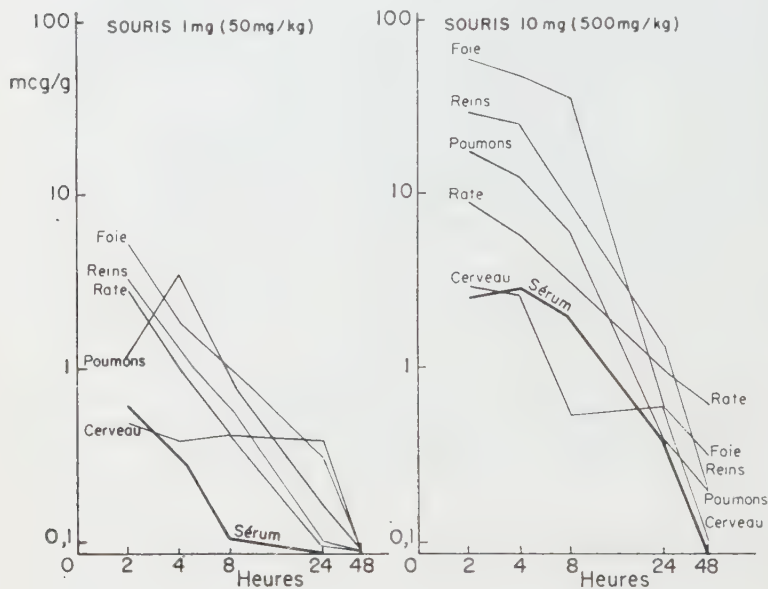


FIG. 2. — Courbes d'élimination chez la souris.

dispersée de 25 à 42, et dans le poumon une moyenne de 17,6 μg (7 à 52 $\mu\text{g/g}$).

Dans la rate on ne trouve en moyenne que 8,7 $\mu\text{g/g}$.

L'étude statistique de ces résultats montre des écarts-types importants, et finalement seul le taux moyen de la rate diffère significativement de celui observé dans le foie, le rein et le poumon.

Si l'on compare les résultats obtenus avec ces deux doses, on s'aperçoit que les concentrations tissulaires sont assez grossièrement proportionnelles aux doses et que l'augmentation de concentration en passant de 1 à 10 mg/kg, varie de cinq à dix fois pour les différents organes.

D'une façon générale, les concentrations tissulaires, deux heures

après l'ingestion, sont considérablement supérieures aux concentrations sanguines.

Il est intéressant d'étudier leur élimination.

b) *Courbes d'élimination.* — D'une façon générale, dans les premières heures, c'est-à-dire à deux heures, quatre heures et huit heures, le rapport entre les taux sériques et les taux tissulaires est voisin des rapports signalés précédemment.

Avec la dose de 1 mg, alors que le taux sérique est nul à la vingt-quatrième heure, on observe des taux compris entre 0,1 et 0,4 $\mu\text{g/g}$ dans le foie, les poumons et la rate, mais au bout de quarante-huit heures, aucune trace d'antibiotique n'est plus décelable dans aucun organe (fig. 2).

Avec la dose de 10 mg, il subsiste, au bout de vingt-quatre heures, des taux tissulaires se maintenant entre 0,6 et 1,3 $\mu\text{g/g}$, alors qu'il reste 0,35 $\mu\text{g/ml}$ dans le sérum.

Cette dose de 10 mg semble constituer un réservoir dans les tissus puisque, à quarante-huit heures, alors que les taux sériques sont indosables, les taux tissulaires ne sont pas significativement différents de ceux obtenus au bout de vingt-quatre heures.

Il semble donc que les fortes doses soient capables d'amener une imprégnation prolongée de l'organisme.

B. LAPINS. — Les mêmes études d'élimination de la tétracycline dans le sérum et les organes ont été tentées chez le lapin. Mais un seul lapin ayant été choisi pour chaque temps d'étude (deux, quatre, huit et quarante-huit heures), on a observé des résultats très discordants, dus vraisemblablement aux différences d'élimination d'un animal à l'autre.

La dose de 50 mg/kg ne donne des taux décelables que dans le sérum et les reins.

Avec la dose de 500 mg/kg, l'absorption particulièrement lente chez le lapin à jeun n'a pas permis d'étudier à proprement parler une courbe d'élimination.

Les différents organes ont montré en général des taux supérieurs aux taux sériques, mais contrairement à ce qui a été observé chez la souris, ce n'est pas le foie qui contient les concentrations les plus importantes, mais le rein.

RÉSUMÉ.

Le dosage de la tétracycline dans les organes exige des précautions particulières en ce qui concerne les gammes étalon.

On a employé une méthode en couche mince unique utilisant *Bacillus cereus* ATCC 9634 comme germe test, les gammes étalon et les échantillons contenant 10 p. 100 de broyat d'organe dans du tampon à pH 4,5.

Un broyage séparé des organes de chaque animal d'expérience, par une méthode précédemment décrite, a permis de mettre en évidence une très grande dispersion des résultats suivant les animaux.

Chez la souris, pendant les premières heures d'élimination, on trouve dans les différents organes des concentrations de cinq à dix fois supérieures à celles observées dans le sérum, et c'est dans le foie que les concentrations les plus élevées ont été mises en évidence.

Des doses élevées de 500 mg/kg, qui donnent une concentration sérique chez la souris voisine de celle obtenue chez l'homme avec les doses de traitement habituel, fournissent des taux tissulaires qui s'éliminent très lentement et représentent encore des taux thérapeutiques quarante heures après l'ingestion.

SUMMARY

TISSULAR CONCENTRATIONS OF TETRACYCLINS.

The assay of tetracyclin in the various organs of the animal body requires special care as to the standard curves.

The authors used a monolayer technique, with *Bacillus cereus* ATCC 9634 as test-organism, the standard concentrations and the samples containing a 10 % tissue suspension in a buffer at pH 4,5.

The organs of each animal have been separately grinded and a method previously described by the authors allowed to demonstrate a great variability of the findings according to the animals.

In mice, much higher levels are found in the different organs than in serum during the first hours of elimination. The highest levels have been demonstrated in the liver.

Doses of 500 mg/kg, yielding in mice serum levels much alike those obtained in man with the usual treatment dosage, yield high tissue levels, the antibiotic is very slowly eliminated from the tissues, where therapeutic levels are still found 40 hours after ingestion.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHABBERT (Y.), BOYER (F.), SAVIARD (M.), BOULINGRE (H.) et HERVÉ (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 760.
- [2] PELLERAT (J.) et MAILLARD (M. A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1958, **247**, 894.
- [3] BÉNAZET (F.) et DUBOST (M.). *Antib. Ann.*, 1958-1959.
- [4] WELCH (H.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1959-1951, **53**, 253.
- [5] HARRELL (W. E.) et HEILMAN (F. R.). *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1949, **24**, 157.
- [6] SANTI (R.) et SERUMBRE (M.). *Boll. Ist. sieroter. milan.*, 1951, **30**, 305.
- [7] BOTTINGER (L. E.). *Acta med. scand.*, 1955, **151**, 343.

- [8] HELANDER (S.) et BOTTINGER (L. E.). *Acta med. scand.*, 1953, **147**, 71.
 - [9] PENSACK (J. M.), BALWIN (R. S.), KLUSSENDORF (R. C.) et CRAIG (G. H.). *Antib Ann.*, 1953-1954, 404.
 - [10] LUTHER (H. G.), REYNOLDS (W. M.), McMAHAN (J. R.) et KERSEY (R. C.). *Antib. Ann.*, 1954-1955, 348.
 - [11] RUSOFF (L. L.), HESTER (H. H.) et LANDAGORA (F. T.). *Antib. Ann.*, 1954-1955, 348.
 - [12] CHABBERT (Y.) et BOULINGRE (H.). *Rev. fr. et Clin. Biol.*, 1957, **2**, 636.
 - [13] GROVE (D.) et RANDALL (W. A.). *Assay methods of antibiotics.*, Med. Encyclop. Inc., New York, 1955.
 - [14] BARME (M.) et CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 256.
-

ÉTUDE ANTIGÉNIQUE DE *CORYNEBACTERIUM ACNES* PAR L'ÉPREUVE D'HÉMAGGLUTINATION PASSIVE.

ANTIGÈNES COMMUNS AVEC D'AUTRES CORYNÉBACTÉRIES

par B. CAILLE et M. TOUCAS (*).

(Chaire d'Hygiène et Clinique de la première enfance,
Hôpital Trousseau, et Institut Pasteur, Service des Vaccins)

De nombreuses souches de *Corynebacterium acnes* sont auto-agglutinables à l'isolement. Ce caractère en empêche l'étude sérologique par la méthode classique d'agglutination. Nous avons essayé d'appliquer à ce groupe la technique d'hémagglutination employée déjà pour un grand nombre de bactéries [1, 2]. Nous avions à notre disposition une vingtaine de souches isolées de malades présentant de l'acné juvénile. La plupart de ces souches auto-agglutinaient à l'isolement. Notons que *Corynebacterium acnes* était presque toujours associé à un staphylocoque blanc non pathogène ; une fois seulement nous l'avons trouvé en association avec un staphylocoque mannitol et coagulase positif.

Dans la réaction d'hémagglutination passive, les fractions polysidiques des bactéries sont adsorbées sur des globules rouges de mouton et ces globules sensibilisés mis en présence des sérums étudiés.

Avant d'immuniser les lapins, nous avons recherché la présence d'agglutinines naturelles anti-*Corynebacterium acnes*.

Nous avons employé pour ces épreuves la méthode d'agglutination en utilisant des souches de *C. acnes* donnant des suspensions stables. Sur 77 sérums de lapins contrôlés par la méthode d'agglutination, 12 sérums donnent des résultats positifs, l'un des sérums agglutinant au 1/200, 5 au 1/100 et 6 au 1/150.

La lecture de l'agglutination est faite après centrifugation. Les chiffres donnés sont ceux de la dilution terminale du sérum donnant une agglutination visible. Nous avons choisi des lapins ayant un sérum dépourvu d'agglutinines naturelles et nous avons préparé avec 7 souches de *C. acnes*, 7 sérums immuns.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} octobre 1959.

Les lapins ont reçu en injection intraveineuse une suspension de germes chauffés une heure à 60°, suspension titrant 2 milliards de bactéries par centimètre cube. On fait 4 injections à quatre jours d'intervalle : 0,5 cm³, 1 cm³, 1,5 cm³ et 2 cm³. Dix jours après la dernière injection quelques gouttes de sang sont prélevées pour s'assurer de la teneur en anticorps. Si celle-ci est jugée satisfaisante, l'animal est saigné à blanc. Les taux d'agglutination trouvés variaient selon les souches de 1/3 200 à 1/16 000. Le sérum récolté stérilement est ensuite conservé à + 4°.

Pour préparer l'extrait antigénique à partir des bactéries, nous avons plusieurs possibilités. Nous en avons essayé trois :

1° Suspension des germes en eau physiologique, chauffée deux heures à 100° ;

2° Suspension des germes en eau physiologique, chauffée une heure à 60° ;

3° Suspension des germes en eau physiologique passée une demi-heure aux ultra-sons, sous atmosphère d'hydrogène.

Les essais nous ont montré que les meilleurs taux d'hémagglutination étaient obtenus avec le surnageant de la préparation n° 1. D'autre part le temps de sensibilisation des globules rouges peut être variable. Nous avons essayé les variantes de sensibilisation suivantes :

a) Une heure, deux heures et quatre heures à la température du laboratoire ;

b) Une heure et deux heures à 37°.

Nous avons obtenu des résultats à peu près équivalents dans les différents cas, et c'est tout simplement pour des raisons de facilité d'horaire que nous avons adopté la sensibilisation de deux heures à la température du laboratoire.

En résumé, la technique adoptée est la suivante :

Culture de quarante-huit heures de *Corynebacterium acnes* en bouillon VF glucosé préalablement régénéré. Après centrifugation, on récolte en eau physiologique de façon à avoir au moins 12 cm³ de suspension bactérienne assez dense (une dizaine de milliards de germes par centimètre cube). La suspension est portée au bain-marie deux heures à 100°, puis centrifugée, et à 10 cm³ de ce surnageant contenant les antigènes bactériens on ajoute 0,2 cm³ de globules rouges de mouton frais, lavés deux fois à l'eau physiologique. Le mélange est abandonné deux heures à la température du laboratoire.

Après sensibilisation, les globules rouges sont centrifugés et lavés deux fois à l'eau physiologique. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 10 cm³ d'eau physiologique afin d'avoir

une suspension de globules rouges à 2 p. 100. Les globules rouges sensibilisés et le sérum étudié préalablement inactivé une demi-heure à 56° sont alors mis en présence. Dans chaque tube, on met IV gouttes de la dilution de sérum (on fait des dilutions au 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, etc.) et II gouttes de globules de mouton sensibilisés. Le tout est porté au bain-marie à 37° une heure et demie. Chaque réaction comporte un tube témoin du sérum (avec des globules rouges non sensibilisés) et un tube témoin globules (globules sensibilisés et eau physiologique). La lecture se fait le lendemain, à l'aide d'un miroir concave : l'agglutination des globules est très nette. Les chiffres donnés dans les tableaux sont l'inverse de la dernière dilution terminale du sérum donnant une agglutination visible.

RÉSULTATS.

1° Concernant l'espèce *C. acnes* seule : les hémagglutinations croisées pratiquées avec les 20 souches de *C. acnes* vis-à-vis des 7 sérums ne nous ont pas permis de faire une distinction sérologique nette entre ces 20 souches. Toutefois, les souches H.101 et

TABLEAU I. — Hémagglutinations croisées entre souches de *C. acnes* et sérums de lapin anti-*C. acnes*.

Extraits antigéniques des souches	Sérums anti <i>C. acnes</i>						
	A 179	53.119	958	C 303	H 505	N	B
A 179	1.200	300	300	600	600	1.200	600
53.119	600	600	300	150	150	300	300
958	1.200±	300	1.200±	600	1.200±	600	1.200
C 303	600	600	300	2.400	300	1.200	600
H 505	300	300	300	600	1.200	600	1.200
N	150	300	150	300	1.200	1.200	600±
B	300	150	300	1.200	2.400	2.400	2.400
53.117	150	150	75	150	300	300	150
P 606	150	600	150	150	300	300	150
744	600±	300	600	600	1.200	600	600
G 6.56	150	600	300	300	2.400	1.200	1.200
H 101	150	0	0	600	300	600	300
H 707	2.400	600	600	1.200	2.400	2.400	1.200
H 808	600	300±	300	600	1.200	1.200±	1.200
C 6.57	600	75	300	600	1.200	600	600
H 1.040	150	150	600	1.200	600	1.200	600
H 1.030	1.200	1.200	600	600	600±	300	600
H 1.010	300	300	300±	300	150	300	300

53.117 ne donnent que des titres faibles vis-à-vis de nos 7 sérums avec un maximum à 1/600 pour la souche H.101 et 1/300 pour la souche 53.117. Pour parfaire ce travail, il serait nécessaire de pratiquer des analyses antigéniques des souches par saturations systématiques des sérums, afin de rechercher les antigènes spécifiques des souches, s'ils existent.

Le tableau I donne les résultats des réactions.

2° Nous avons ensuite cherché s'il existait des communautés antigéniques entre l'espèce *C. acnes* et d'autres Corynébactéries.

Parmi celles-ci, six espèces anaérobies strictes ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux. On a pu les incriminer à l'origine de maladies humaines : septicémies, endocardites, pleurésies purulentes, méningites ; on les trouve avec une certaine fréquence à l'hémoculture au cours d'hémopathies malignes [3]. Ces six espèces sont *Corynebacterium parvum*, *C. avidum*, *C. granulorum*, *C. liquefaciens*, *C. anaerobium* et *C. diphtheroides* (1).

Les antigènes de ces espèces ont été étudiés en 1954 par Linzenmeier [4] par la méthode des agglutinations croisées, complétée par celle de l'absorption des anticorps. Nous avons repris cette étude par l'hémagglutination passive en mettant en présence les six espèces précédentes avec six sérums de lapins inoculés avec les mêmes germes. Les deux techniques ont donné le même résultat [3 et 5] :

a) Présence de communautés antigéniques étroites entre les espèces *C. parvum*, *C. avidum*, *C. anaerobium*, *C. liquefaciens* ;

b) Communauté partielle entre les précédentes et *C. granulorum* ;

TABLEAU II. — Hémagglutinations croisées entre 4 souches de *C. acnes* et 5 sérums anti-*C. parvum*, *C. liquefaciens*, *C. avidum*, *C. anaerobium* et *C. granulorum*.

Souches	S é r u m s					
	anti <i>C. acnes</i> homologue à la souche	anti <i>C. parvum</i> 936	anti <i>C. avidum</i> 961	anti <i>C.</i> <i>anaerobium</i> 758	anti <i>C.</i> <i>liquefaciens</i> 884	anti <i>C.</i> <i>granulosum</i> 714
<i>C. acnes</i> N	1.200	1.200	2.400	1.200	0	2.400
<i>C. acnes</i> B	2.400	1.200	2.400	4.800	0	2.400
<i>C. acnes</i> A 179	1.200	600	2.400	4.800	0	2.400
<i>C. acnes</i> 303	2.400	2.400	2.400	4.800	150	4.800

(1) Nous remercions le professeur A. R. Prévot, chef du Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur, de nous avoir obligeamment fourni les souches nécessaires à cette étude.

c) Distinction nette du point de vue sérologique entre *C. diphteroïdes* et les cinq précédentes.

Nous avons alors recherché les communautés antigéniques éventuelles entre diverses souches de l'espèce *C. acnes* et une souche de chaque espèce *C. parvum*, *C. avidum*, *C. anaerobium*, *C. liquefaciens*, *C. granulosum* et *C. diphteroïdes*.

Le tableau II donne les résultats des hémagglutinations passives faites entre 4 souches de *C. acnes* et les sérums anti-Corynébactéries des six autres espèces.

Le tableau III donne les résultats des hémagglutinations passives faites entre les six espèces et quatre sérums anti-*C. acnes*.

TABLEAU III. — Hémagglutinations croisées entre 6 souches de Corynébactéries pathogènes et 4 sérums anti-*C. acnes*.

Souches	S é r u m s				
	anti corynébactéries homonymes des souches	anti <i>C. acnes</i>	anti <i>C. acnes</i>	anti <i>C. acnes</i>	anti <i>C. acnes</i>
		N	B	A 179	303
<i>C. parvum</i> 936	4.800	1.200	1.200	1.200	2.400
<i>C. avidum</i> 961	1.200	600	600	75	600
<i>C. anaerobium</i> 758	4.800	2.400	2.400	1.200	1.200
<i>C. liquefaciens</i> 889	300	2.400	1.200	2.400	4.800
<i>C. granulosum</i> 744	4.800	4.800	4.800	4.800	2.400
- 583	2.400	4.800	2.400	2.400	4.800
<i>C. diphteroïdes</i> 379	2.400	0	0	0	0
- 1.626	1.200	0	0	0	0

Il apparaît qu'au point de vue sérologique les espèces étudiées se groupent en deux types :

PREMIER GROUPE : *C. diphteroïdes*.

DEUXIÈME GROUPE : *C. acnes*, *C. parvum*, *C. avidum*, *C. granulosum*, *C. anaerobium*, *C. liquefaciens*.

La communauté antigénique de ce deuxième groupe a été retrouvée en clinique : 49 sujets ont eu simultanément une intra-dermo-réaction à l'antigène de *C. acnes* et une intradermo-réaction à l'antigène de *C. parvum*. La réaction a été positive simultanément chez 18 sujets, avec la même intensité, négative simultanément chez 20 sujets, dissociée une fois seulement [5].

SUMMARY

ANTIGENIC STUDY OF *Corynebacterium acnes*
BY MEANS OF THE PASSIVE HEMAGGLUTINATION TEST.
ANTIGENS COMMON WITH OTHER BACTERIA.

From the serologic point of view the species studied can be divided into two groups :

1. *C. diphteroides* ;
2. *C. acnes*, *C. parvum*, *C. avidum*, *C. granulosum*, *C. anaerobium*, *C. liquefaciens*.

The antigenic relationship between the members of this second group has also been observed clinically. An intracutaneous reaction with *C. acnes* antigen, and an intradermo-reaction with *C. parvum* antigen have been carried out on 49 individuals : the reaction was simultaneously positive in 18, simultaneously negative in 20, dissociated once only.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MIDDLEBROOK (G.) et DUBOS (R.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 521.
 - [2] LE MINOR (L.), LE MINOR (S.) et GRABAR (J.). *Ann. Inst. Pasteur.*, 1952, **83**, 62.
 - [3] CAILLE (B.). *Contribution à l'étude des antigènes des Corynebactéries anaérobies*. Thèse Paris, 1958.
 - [4] LINZENMEIER (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 572.
 - [5] TURPIN (R.), PRÉVOT (A.-R.), CAILLE (B.) et CRUVEILLER (J.). *Sem. Hôp. Paris, Ann. Péd.*, 24 mai 1959, n° 24-25.
-

LE MÉTABOLISME DE L'ACIDE GLUTAMIQUE AU COURS DE LA SPORULATION CHEZ *BACILLUS MEGATERIUM*

par Jacqueline MILLET et Jean-Paul AUBERT (*).

(Institut Pasteur, Laboratoire des Isotopes)

Les constituants organiques de la spore bactérienne proviennent à peu près exclusivement de ceux de la cellule végétative qui donne naissance à la spore. Mais on ne sait pas, surtout en ce qui concerne les protéines et les acides nucléiques, comment, à partir des constituants de la cellule, se forment ceux de la spore. Ainsi, on peut imaginer que les protéines de la spore résultent d'une sélection parmi les protéines cellulaires, ou d'une nouvelle biosynthèse à partir de fragments peptidiques, ou même d'amino-acides libérés par les enzymes protéolytiques.

D'autre part, on sait que la spore possède un équipement enzymatique capable de réaliser un grand nombre de réactions classiques du métabolisme intermédiaire [1, 2]. Mais on connaît mal, au cours de la sporulation, c'est-à-dire pendant les quelques heures nécessaires à la transformation de la cellule végétative en spore, avec quelle intensité et dans quel sens fonctionnent les systèmes enzymatiques étudiés isolément.

Dans la cellule de *Bacillus megaterium* en croissance, l'acide glutamique représente plus de la moitié du pool en amino-acides libres et environ 20 p. 100 des différents composés libres de petit poids moléculaire. Ce composé, qui participe aussi bien au métabolisme intermédiaire qu'à celui des protéines, est un objet convenable pour aborder l'étude des questions rapportées ci-dessus.

Nous nous sommes donc demandé quelle était l'évolution de l'acide glutamique libre au cours de la sporulation par carence glucosée chez *Bacillus megaterium*, en l'étudiant sous deux aspects : celui de la variation, en fonction du temps, du pool en acide glutamique et celui du métabolisme éventuel de cet acide qui a été décrit par Martin et Foster [3] comme un précurseur possible de l'acide dipicolinique des spores.

(*) Manuscrit reçu le 8 octobre 1959.

I. — TECHNIQUES.

1° BACTÉRIOLOGIQUES. — La souche utilisée a été isolée de la terre en 1949 ; elle est désignée sous la référence « souche M. A. ».

Pour obtenir une croissance et une sporulation aussi homogènes que possible, on procède de la manière suivante :

a) *Préculture en milieu complexe* : Flacons d'Erlenmeyer de 1 l, contenant 100 ml de milieu, agités à 30°.

Milieu de culture (milieu I) :

ClNH_4	2	g
PO_4HNa_2 , 12 H_2O	6	g
PO_4KH_2	3	g
ClNa	3	g
Cl_2Mg , 6 H_2O	0,1	g
Cl_2Mn , 4 H_2O	0,01	g
SO_4Na_2	0,11	g
Extrait de levure DIFCO	2	g
Glucose	1	g
Eau distillée	q. s p.	1 l
pH	6,8	

On ensemence ce milieu avec une suspension de spores (concentration : 0,05 mg/ml), temps de germination : deux heures, taux de croissance : 1,2 division/heure. Après deux à trois générations, le milieu est centrifugé, les bactéries récoltées servent à l'ensemencement du milieu synthétique.

b) *Culture en milieu synthétique* : Flacons d'Erlenmeyer de 100 ml contenant 10 ml de milieu, ou tubes à essais de 18/180 contenant 1 ml de milieu, agités à 30°. Milieu de culture (milieu II) identique au milieu I, mais dépourvu d'extrait de levure.

On ensemence avec une suspension de bactéries provenant du milieu I (concentration : 0,16 mg/ml), taux de croissance : 0,8 division/heure, épuisement du glucose entre trois heures et trois heures trente d'incubation, rendement de croissance : 0,56.

2° CHIMIQUES. — Les composés radioactifs uniformément marqués au ^{14}C sont préparés au laboratoire : glucose (15 mC/mMol), acide L(+) glutamique (74 mC/mMol).

La radioactivité des cellules ou des spores est déterminée par filtration de la suspension sur millipores et comptage.

Pour l'étude des composés de faible poids moléculaire, on centrifuge les bactéries ou les spores, on les lave à l'eau glacée, puis les extrait deux fois à l'alcool à 80 p. 100 bouillant pendant une minute. L'extrait est ensuite chromatographié sur papier.

Pour l'étude des protéines des spores, le résidu insoluble dans l'alcool est extrait par l'acide trichloracétique (TCA) à 5 p. 100 à 90° pendant trente minutes. L'insoluble représente à peu près uniquement la fraction protéique, les spores étant pratiquement dépourvues de polysides

et de lipides. Le résidu protéique est hydrolysé pendant seize heures à 100° dans HCl 6 N ; on procède ensuite à la chromatographie sur papier et à la radioautographie.

II. — RÉSULTATS.

1° EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DE LA CELLULE AU COURS DU CYCLE DE CROISSANCE. — Dans les conditions définies ci-dessus, le cycle de croissance spore-spore est reproductible à une demi-heure près. L'examen des cellules au microscope permet de noter, en fonction du temps, les modifications suivantes :

Milieu I.

0-2 heures		Germination des spores.
2-4 heures		Croissance exponentielle, cellules normales.

Milieu II.

0-3 heures		Croissance exponentielle, épuisement du glucose à 3 heures, cellules normales.
3-6 heures		Cellules normales.
6-7 h 30		Apparition aux extrémités des bâtonnets de plages dépourvues de granulations (plages roses).
7 h 30-8 h 30	...	Apparition des spores incluses.
3 h 30-15 heures	.	Spores incluses, augmentation de la réfringence, de la taille des spores.
15-17 heures		Libération des spores.

2° ETUDE QUANTITATIVE DE LA CROISSANCE SUR LE MILIEU II. — *Expérience I.* — Dans cette expérience nous étudions les variations du pool en acide glutamique au cours de la croissance et de la sporulation.

Le milieu II contient 32 μ C/ml de glucose radioactif. A intervalles réguliers, on dose le glucose, mesure la radioactivité des cellules et du milieu et détermine la composition de l'extrait alcoolique.

Le tableau I rapporte les résultats obtenus, nous y avons fait figurer également ceux relatifs à l'acide dipicolinique qui, avec l'acide glutamique, représente la majeure partie de l'extrait alcoolique de la spore.

Cette expérience montre que :

a) La radioactivité totale des bactéries est maxima à la fin de la phase de croissance, puis diminue régulièrement par la suite. Tant que les spores ne sont pas libérées, la radioactivité du milieu n'augmente pas ; la diminution de la radioactivité des bactéries

TABLEAU I.

Temps (heures)	Glucose restant (μg)	Radioactivité (c/min.)			
		Cellules ($\times 10^{-6}$)	Milieu ($\times 10^{-6}$)	Acide glutamique	Acide dipicolinique
0.	780	0	7,9	0	0
1.30	420	2,2	4,7	7.000	0
2.30	143	4,5	1,3	13.000	0
3.	0	5,4	0,6	19.000	0
3.30	-	5,4	0,6	34.000	0
4.	-	5,0	0,6	57.000	0
4.30	-	4,9	0,6	43.000	0
6.	-	4,6	0,6	40.000	0
7.	-	4,1	0,6	40.000	0
8.	-	4,0	0,6	38.000	12.000
9.	-	3,9	0,6	36.000	36.000
10.	-	3,8	0,6	18.000	86.000
11.	-	3,7	0,6	17.000	116.000
12.	-	3,7	0,6	15.000	127.000
13.	-	3,6	0,6	14.000	114.000
14.	-	3,5	0,6	13.000	123.000
25.	-	2,4	1,8	15.000	113.000
Toutes les mesures sont rapportées à 1 ml de milieu					

traduit donc l'oxydation complète d'un certain nombre de composés représentant plus de la moitié en poids de la matière sèche initiale. En revanche, au moment de la libération des spores, on observe une augmentation importante de la radioactivité du milieu.

b) A la fin de la phase de croissance, c'est-à-dire à la troisième heure, la concentration de l'acide glutamique libre dans la cellule est de l'ordre de 0,4 p. 100 ; elle triple pendant l'heure suivante.

Cette augmentation n'est pas accompagnée d'une augmentation de la radioactivité totale des cellules, excluant ainsi une croissance sur un éventuel produit de dégradation du glucose présent dans le milieu. La composition de l'extrait alcoolique à la fin de la phase de croissance infirme l'hypothèse selon laquelle l'acide glutamique proviendrait des différents composés du cycle de Krebs ou d'un composé quelconque de faible poids moléculaire. Il est

peu probable également que cet acide provienne de l'hydrolyse enzymatique des protéines de la bactérie puisque aucun autre amino-acide libre n'apparaît concurremment à l'acide glutamique. Enfin, l'hypothèse de l'hydrolyse d'un peptide glutamique est également peu vraisemblable, aucun composé de ce type n'ayant jamais été décrit chez *Bacillus megaterium*, ni trouvé par nous-mêmes dans notre souche.

L'hypothèse la plus plausible est que cet amino-acide provient du métabolisme des réserves glucidiques et lipidiques de la bactérie dont on connaît la disparition au moment de la sporulation.

c) A partir de la quatrième heure le contenu en acide glutamique libre diminue à nouveau jusqu'à la libération des spores qui en contiennent, en valeur absolue, une quantité à peu près équivalente à celle trouvée dans les cellules en fin de croissance et relativement à la masse cellulaire environ deux fois plus.

d) L'acide dipicolinique, dont l'existence a été démontrée par Powell et Strange [4], apparaît précisément lorsque les spores incluses commencent à être visibles ; sa synthèse est linéaire entre huit et onze heures d'incubation.

3° MÉTABOLISME DE L'ACIDE GLUTAMIQUE AU COURS DE LA SPORULATION. — *Expérience II.* — L'expérience I montre l'augmentation puis la diminution de l'acide glutamique libre dans la cellule en cours de sporulation, mais ne donne aucun renseignement sur le métabolisme de ce composé. Dans l'expérience II nous nous proposons d'étudier ce métabolisme en ajoutant dans le milieu, à des temps différents après la fin de la croissance, de l'acide glutamique radioactif et en analysant les spores formées dans ces conditions.

Les bactéries sont cultivées sur le milieu II contenant du glucose non radioactif. A partir de la fin de la phase de croissance (temps 0 du tableau II), on prélève toutes les heures, jusqu'à l'apparition des spores incluses, 1 ml de culture (équivalent à 0,73 mg poids sec de bactéries en fin de croissance, contenant 2,8 μg d'acide glutamique libre). Ce prélèvement est transféré dans un tube à essai contenant de l'acide L(+)glutamique radioactif (14,7 μg , $1,6 \cdot 10^6$ c/min, concentration finale : $1 \cdot 10^{-4}$ M), où la sporulation se poursuit. L'analyse des spores est faite seize heures après la fin de la croissance.

Des tubes témoins, ne contenant pas d'acide glutamique, montrent que l'évolution de la sporulation et le nombre de spores formées sont les mêmes que dans les tubes expérimentaux.

Nous rapportons dans le tableau II les mesures, en fin d'expérience, de la radioactivité du milieu et des spores.

TABLEAU II.

Heure du prélèvement	Morphologie des cellules	MILIEU (c/min.)	S P O R E S		
			extrait alcoolique (c/min.)	extrait TCA chaud (c/min.)	Protéines (c/min.)
0	cellules normales	280.000	20.000	8.300	52.000
1	cellules normales	250.000	32.000	8.000	56.000
2	cellules normales	290.000	48.000	16.000	70.000
3	plages roses	320.000	80.000	27.000	95.000
4	plages roses	222.000	140.000	22.000	100.000
5	spores incluses	225.000	180.000	54.000	97.000

D'autre part, l'analyse chromatographique des différentes fractions montre :

a) *Extrait alcoolique* : la radioactivité de cet extrait est contenue en majeure partie dans l'acide glutamique et dans l'acide dipicolinique. Le tableau III rapporte la radioactivité incorporée dans ces deux composés.

TABLEAU III.

Heure du prélèvement	Acide glutamique libre (c/min.)	Acide dipicolinique (c/min.)
0	1.000	9.200
1	1.500	15.200
2	2.900	24.800
3	7.350	27.000
4	16.500	66.000
5	30.600	97.500

b) *Extrait trichloracétique* : une faible partie de la radioactivité se retrouve dans la fraction nucléique, la majeure partie est représentée par l'acide dipicolinique qui n'est pas totalement extractible à l'alcool aqueux bouillant.

c) *Fraction protéique* : tous les acides aminés trouvés dans les spores sont radioactifs, quel que soit le moment de l'addition de l'acide glutamique. La radioactivité de cet acide représente environ 30 p. 100 de la radioactivité totale des protéines.

Selon le moment de l'addition de l'acide glutamique, on observe des variations dans la radioactivité finale des différents acides aminés. Le tableau IV rapporte quelques exemples de mesures.

TABLEAU IV.

Heure du prélèvement	Acide glutamique (c/min.)	Acide aspartique (c/min.)	Alanine (c/min.)	Proline (c/min.)
0	8.000	3.600	3.200	680
1	8.000	4.400	3.300	1.280
2	20.000	8.400	6.800	1.600
3	28.000	8.800	6.800	2.800
4	30.000	8.400	6.400	2.000
5	28.000	5.600	6.400	1.600

Il ressort de ces différents résultats que :

1° L'acide glutamique exogène ajouté aux cellules, depuis la fin de la phase de croissance jusqu'au stade spores incluses, est fortement métabolisé, puisque à la fin de l'expérience on ne retrouve, en ajoutant la radioactivité du milieu à celle des spores, qu'entre 32 et 35 p. 100 de la radioactivité initiale, le reste étant perdu sous forme de CO_2 . D'autre part, la radioactivité restant dans les spores sous forme de composés de faible poids moléculaire comme l'acide glutamique ou l'acide dipicolinique et dans les amino-acides des protéines augmente d'autant plus que l'addition de l'acide glutamique radioactif est plus tardive.

2° Cette augmentation de la radioactivité de l'acide glutamique libre ou protéique des spores peut s'expliquer par l'hypothèse suivante : l'acide glutamique radioactif se mélange avec l'acide glutamique non radioactif d'un pool alimenté par d'autres sources non radioactives endogènes et subit le sort commun de ce pool : oxydation jusqu'au stade CO_2 , biosynthèse de l'acide dipicolinique, des amino-acides et incorporation dans les protéines. On comprend ainsi que plus on ajoute tard l'acide glutamique à ce système, plus la dilution isotopique est faible. L'évolution de la radioactivité des autres amino-acides des protéines et de celle de l'acide dipicolinique s'accorde également avec cette hypothèse.

3° L'incorporation de la radioactivité provenant de l'acide glutamique dans différents amino-acides protéiques montre, qu'au moins jusqu'au stade spores incluses, les cellules métabolisent encore activement l'acide glutamique libre et l'incorporent, ainsi que les amino-acides qui en dérivent, dans les protéines des spores.

CONCLUSION.

Dans un travail sur les spores microbiennes, il est toujours très difficile d'affirmer que le matériel d'étude est composé uniquement de spores. Nous avons pris les précautions habituelles de lavage, de contrôle microscopique et de numération, qui permettent de penser que les phénomènes observés dans l'expérience II portent effectivement sur la spore elle-même et non, par exemple, sur des débris cellulaires présents dans le milieu.

En réponse à la question que nous nous étions posée sur le métabolisme de l'acide glutamique libre au cours de la sporulation par carence glucosée, on peut dire qu'après l'épuisement du glucose la biosynthèse de l'acide glutamique continue activement. La source carbonée est certainement représentée par les réserves glucidiques et lipidiques de la bactérie qui sont complètement métabolisées.

D'autre part, cet amino-acide ne s'accumule pas dans la cellule, il n'est pas non plus excrété dans le milieu, il est soumis au contraire à un métabolisme complexe qui fonctionne au moins jusqu'à la formation des spores incluses et qui aboutit soit à l'oxydation totale, soit à la biosynthèse de l'acide dipicolinique, soit à celle de certains amino-acides qui sont incorporés dans les protéines de la spore.

En ce qui concerne l'origine de ces protéines, ce dernier résultat montre que la cellule est capable d'utiliser, pour leur biosynthèse, l'acide glutamique ou d'autres amino-acides libres, pouvant eux-mêmes provenir du métabolisme de l'acide glutamique.

RÉSUMÉ.

Au cours de la sporulation par carence glucosée chez *Bacillus megaterium*, on observe une augmentation puis une diminution du pool en acide glutamique. Le métabolisme de cet amino-acide est complexe et comprend : l'oxydation complète, la biosynthèse de l'acide dipicolinique et celle de différents amino-acides. L'acide glutamique libre aussi bien que les amino-acides qui en dérivent peuvent être incorporés, au moins jusqu'à la formation des spores incluses, dans les protéines des spores.

SUMMARY

METABOLISM OF GLUTAMIC ACID DURING SPORULATION.

During *B. megaterium* sporulation caused by glucose deficiency, there is first an increase and then a decrease of the glutamic acid pool. The metabolism of this amino-acid is complex and includes

complete oxidation, biosynthesis of dipicolinic acid and other amino-acids. Free glutamic acid, as well as the amino-acids derived from it, can be incorporated into the spore proteins at least until the stage of sporulation cells.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HALVORSON (H.) et CHURCH (B.). *Bact. Rev.*, 1957, **21**, 112.
 - [2] DOY (R.), HALVORSON (H.) et CHURCH (B.). *J. Bact.*, 1959, **77**, 43.
 - [3] MARTIN (H. H.) et FOSTER (J. W.). *J. Bact.*, 1958, **76**, 167.
 - [4] POWELL (J. F.) et STRANGE (R. E.). *Biochem. J.*, 1953, **54**, 205.
-

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e)

Séance du 3 décembre 1959.

Présidence de M. PRÉVOT.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine. Après les volumes II et III dont il a déjà été rendu compte, voici le volume I du livre de Burnet et Stanley (1), qui achève la trilogie. Ce volume, le plus copieux, est en même temps le meilleur des trois, tant par les sujets traités que par la personnalité des auteurs. Il se compose de 11 chapitres, dont le premier, par Burnet et Stanley, sert d'introduction à l'ensemble de l'ouvrage : les auteurs y tracent le cadre de l'étude des virus envisagée du double point de vue de la particule infectieuse et des relations entre cellule-hôte et virus infectant. Le deuxième chapitre, par S. S. Cohen, est une étude chimique poussée de la structure des constituants cellulaires, analysée à la fois du point de vue du métabolisme et sous l'angle de la formation des polymères. Les 200 pages de ce chapitre, remarquable à tous points de vue, auraient à elles seules suffi à former la matière d'un livre complet dont il n'existe pas à l'heure actuelle l'équivalent. Le chapitre suivant est rédigé par H. K. Schachman et R. C. Williams ; il comporte l'étude des propriétés physiques de la particule infectante du virus, et réunit de façon heureuse les données classiques sur les techniques les plus récentes ; la microscopie électronique fait, bien entendu, partie de ce chapitre général. Le problème si débattu des relations quantitatives entre les particules virales et leur activité ou leur pouvoir infectant est exposé par C. E. Schwerdt au chapitre IV d'une façon à la fois claire et condensée. Le chapitre V est consacré à l'inactivation des virus par S. Gard et O. Maaløe ; c'est une revue générale très complète des différentes méthodes qui ont pu être appliquées ou dont l'application a été suggérée pour réaliser l'inactivation des virus. H. Fraenkel-Conrat traite au chapitre VI la question de la base chimique de l'infectiosité dans le cas du virus de la mosaïque du tabac : étude d'actualité et qui, étant donné le sujet, repose pour une large part sur les travaux personnels de l'auteur. De son côté, E. A. Evans expose le même problème du point de vue du bactériophage et y passe en revue des travaux désormais classiques. Enfin les virus animaux sont

(1) F. M. Burnet et W. M. Stanley : *The Viruses. Biochemical, biological and biophysical properties*. Vol. 1 : *General Virology*. Academic Press, New York et Londres, 1959, 23×15,5, 609 pages. Prix : \$ 16.50.

à leur tour examinés sous le même angle par W. Schäfer dont la mission était nécessairement plus ardue ; il s'en tire avec honneur. Au chapitre IX, c'est l'étude biochimique des virus des insectes que nous trouvons sous la plume de G. H. Bergold, qui a développé surtout les travaux de l'Institut de Sault-Sainte-Maris, et qui renvoie pour une revue générale de l'ensemble à un autre ouvrage. Au chapitre X, on trouvera l'exposé des méthodes immunologiques appliquées à l'identification des virus ; F. M. Burnet a rédigé cette étude d'une façon à la fois classique et assez complète. Le dernier chapitre dû à S. E. Luria étudie le problème de la reproduction des virus en prenant surtout pour exemples les notions acquises à propos du bactériophage.

Dans l'ensemble, ce volume réunit une masse d'informations considérables : il souligne, par la part prépondérante donnée à l'aspect biochimique du problème des virus, l'évolution actuelle des recherches et la voie des travaux futurs. A la fois par la documentation qu'il apporte au lecteur, par la qualité des exposés, et par l'esprit dans lequel il est rédigé, cet ouvrage est certainement aujourd'hui le plus moderne et le plus utile pour donner au travailleur qui se lance dans le domaine des virus la formation de base avec laquelle il entrera de plain-pied dans le sujet.

COMMUNICATIONS

A PROPOS DU COMPORTEMENT ANTIGÉNIQUE DE *TREPONEMA PALLIDUM* ULTRASONNÉ

par P. GASTINEL, A. VAISMAN, A. HAMELIN et F. DUNOYER.

(*Institut Alfred-Fournier*)

A plusieurs occasions Gastinel [1] et ses collaborateurs ont montré que l'introduction de tréponèmes tués par voie endoveineuse et à doses répétées est susceptible de faire réapparaître les immobilisines chez des lapins syphilitiques dont le « test de Nelson » était devenu négatif après traitement à la pénicilline. Bien plus, l'introduction des tréponèmes morts par voie veineuse, à plusieurs reprises, peut provoquer chez un animal neuf, lapin ou souris, une réaction d'immobilisation dont nous avons longuement précisé les modalités.

Au moment de nos premières recherches (1951), Mc Leod et Magnuson [2] faisaient des constatations analogues. Dans toutes ces diverses expériences *Treponema pallidum* était tué par la chaleur ou le formol. Les auteurs américains ont utilisé l'action d'un produit arsenical, le mapharsen.

Pour démontrer avec de nouveaux arguments que l'apparition dans le sérum d'un pouvoir immobilisant relève de la seule pénétration de l'antigène spécifique, nous rapportons aujourd'hui les recherches faites en utilisant les tréponèmes ultrasonnés.

Vaisman, Prudhomme et Hamelin [3] ont établi la valeur antigénique de *Treponema pallidum* soumis aux ultrasons dans le sérodiagnostic de la syphilis. On sait, en effet, que ce germe en suspension dans l'eau physiologique a un pouvoir anticomplémentaire qui le rend inutilisable. Au contraire, l'antigène obtenu par la désintégration des tréponèmes pâles présente un grand intérêt dans les réactions sérologiques, du fait de sa plus grande sensibilité et spécificité sur les antigènes lipidiques et même spirochéliens de la souche *Reiter*, également ultrasonnés.

L'antigène soumis aux ultrasons se présente comme une suspension homogène, légèrement opalescente, constituée de fines granulations provenant des corps tréponémiques désintégrés.

Nous avons employé cet antigène dans nos nouvelles recherches portant tout particulièrement sur les souris.

Souris syphilitées. — Dans un mémoire antérieur [4] nous avons étudié le moment d'apparition des immobilisines après inoculation virulente par voie veineuse ou sous-cutanée. Ces deux modes de pénétration se comportent de façon analogue. Alors que la diffusion tréponémique est régulièrement constatée à l'étude histologique à partir du trentième jour de l'infection, ce n'est qu'après un délai de deux cents à deux cent cinquante jours que les immobilisines sont détectées avec le maximum de fréquence et d'intensité.

Ce délai peut-il être modifié en injectant à l'animal, après l'inoculation infectante, des doses répétées de l'antigène ultrasonné? C'est effectivement ce qui a été observé en faisant, trente jours après l'infection syphilitique, des injections intraveineuses de 0,5 cm³ d'émulsion de *Treponema pallidum* ultrasonné répétées trois fois à cinq jours d'intervalle : le test est positif à 100 p. 100 au cinquante-deuxième jour d'infection, dix jours après la dernière pénétration antigénique. Il devient négatif le cent quatrième et le cent quarante-huitième jour après celle-ci. Mais il se retrouve positif à 100 p. 100 lorsque le délai de l'infection est à cent quatre-vingt-dix-huit et deux cent soixante-cinq jours. Ainsi apparaît dans ce protocole le phénomène d'éclipse, qui se produit trois mois après la pénétration de l'antigène ultrasonné et qui persiste jusqu'au moment où l'infection expérimentale produit dans les délais habituels l'apparition des immobilisines.

C'est un phénomène analogue que l'on observe après injections répétées de tréponèmes vivants. Nous l'avions déjà signalé dans notre mémoire antérieur et l'avons retrouvé en injectant quatre fois de suite à cinq jours de distance des tréponèmes vivants dans les veines d'un lot de souris.

Le test des immobilisines est à 100 p. 100 trente et un jours après la première injection virulente ; il devient négatif au quatre-vingt-quinzième et au cent trente-sixième jour, pour remonter à 100 p. 100 au cent quatre-vingt-dix-neuvième et au deux cent quatorzième jour de la primo-infection. Ici encore se retrouve l'éclipse : elle témoigne que l'apparition précoce des immobilisines répond, soit par la pénétration répétée des tréponèmes vivants, soit par l'inoculation renouvelée de tréponèmes ultrasonnés, au rôle de l'antigène en dehors de toute action infectieuse. Il s'agit d'un phénomène d'antigénie.

Souris neuves. — La démonstration est plus évidente encore lorsque les injections endoveineuses d'émulsion tréponémique ultrasonnée sont pratiquées à des souris neuves.

Un lot de souris reçoit trois fois à cinq jours de distance 0,5 cm³ d'émulsion de tréponèmes ultrasonnés. Le test se trouve à 97 p. 100 quatorze et trente-sept jours après la première injection ; mais il est à 2 p. 100 au cinquante-huitième jour.

Dans un autre protocole similaire, dix-sept jours après la première injection de tréponèmes ultrasonnés, des immobilisines donnent un test à 100 p. 100, mais il fléchit progressivement pour être à 2 p. 100 aux quatre-vingt-dix-septième, cent trente-deuxième et cent quarante-quatrième jours.

Dans d'autres expériences nous avons cherché à établir la dose d'antigène nécessaire pour provoquer l'apparition des immobilisines chez les souris neuves. Une seule dose de 0,6 cm³ a provoqué un test à 52 p. 100 seize jours après l'unique injection.

Deux inoculations d'antigène ont donné un test à 93 p. 100, mais de faible durée.

Trois injections à cinq jours d'intervalle, par voie veineuse, ont produit, cinq jours après la troisième, un test à 83 p. 100. Il monte à 97 p. 100 onze jours après la dernière injection préparante. Les mêmes chiffres et les mêmes délais se retrouvent après quatre injections.

Il apparaît, en bref, que le maximum du test se situe vingt à vingt-cinq jours après le début de la préparation, pour disparaître vers le quarantième ou le quarante-cinquième jour.

L'emploi du tréponème de Reiter soumis aux ultrasons ou formolé, après trois ou quatre injections endoveineuses, n'est parvenu ni à activer l'apparition des immobilisines chez des souris infectées, ni à créer des immobilisines chez des souris neuves. Ceci souligne des différences antigeniques quant à la production des immobilisines, malgré des parentés qui permettent d'utiliser les antigènes tréponémiques fournis par la souche Reiter pour détecter les réagines syphilitiques.

Nous avons vainement essayé de raccourcir les délais d'apparition des immobilisines chez la souris syphilitisée en lui injectant par voie veineuse des antigènes variés. Nous avons échoué dans les tentatives faites avec le vaccin TAB. Des résultats irréguliers et non probants ont été observés avec le sérum de cheval. Notons enfin que les effets provoqués avec l'antigène *Treponema pallidum* ultrasonné ne s'obtiennent pas si les injections sont faites d'une façon répétée par voie intradermique.

Lapins. — Ayant antérieurement étudié la production d'immobilisines chez le lapin par injections répétées de tréponèmes tués, nous nous bornerons à citer quelques exemples montrant que l'antigène *Treponema pallidum* ultrasonné agit de façon identique.

Des lapins syphilitiques depuis plusieurs centaines de jours, avec test à 100 p. 100, sont traités à la pénicilline. Trente-cinq jours après la fin de la thérapeutique, le passage ganglionnaire demeure stérile et cent quatre-vingts jours après, leur test est totalement négatif. Alors sont effectuées des injections intraveineuses d'émulsions de tréponèmes pâles ultrasonnés, et on assiste à la réapparition des immobilisines.

Exemples : Le lapin n° 5 est infecté de syphilis depuis cinq cent

cinquante-neuf jours. Il est traité à la pénicilline. Le passage ganglionnaire est négatif et six mois après la fin du traitement le test est à 2 p. 100. A ce moment des injections de l'émulsion ultrasonnée sont pratiquées par voie veineuse à la dose de 5 cm³ cinq fois consécutives à intervalles de cinq jours. Le test remonte à 78 p. 100 six jours après la cinquième injection ; trente-trois jours après il est à 88 p. 100, et soixante-deux jours après, à 100 p. 100. Cette courbe ascensionnelle fait une chute à 0 p. 100 cent quatre-vingt-douze jours après la cinquième injection et remonte progressivement pour être à 100 p. 100 deux cent quatre-vingts jours après la cinquième injection.

Le lapin n° 7 se trouve dans les mêmes conditions que le précédent. Syphilis de trois cent soixante jours au moment du traitement par la pénicilline. Passage ganglionnaire stérile trente-cinq jours après la fin du traitement. Cent quatre-vingts jours après, le test est négatif. Dès la troisième injection de l'antigène ultrasonné, les immobilisines sont au taux de 60 p. 100. Il est à 87 p. 100 six jours après la cinquième et dernière injection. Il fléchit à 71 p. 100 soixante-deux jours après celle-ci.

Lapin n° 8. Syphilis de trois cent trois jours. Passage ganglionnaire stérile après pénicillinothérapie. Le test des immobilisines devient négatif six mois après la fin du traitement. Cinq injections intraveineuses d'antigène ultrasonné sont répétées à cinq jours d'intervalle. Le test remonte à 95 et 100 p. 100 trente-trois jours et soixante-deux jours après la dernière injection.

La valeur antigénique de l'émulsion de tréponème ultrasonné apparaît, dans ces protocoles, de toute évidence.

Comme nous l'avons déjà dit, l'antigène de tréponème pâle ultrasonné, utilisé dans les réactions de fixation, est doué d'une plus grande sensibilité et spécificité que les antigènes lipidiques et même spirochètiens Reiter. Il permet d'éliminer davantage les fausses réactions positives de la sérologie classique et se rapproche mieux des résultats fournis par le T. I. T.

Mais, en outre, il ressort de nos protocoles qu'il est capable d'autre part de provoquer, par injections endoveineuses répétées, soit la réapparition d'immobilisines disparues après l'action thérapeutique, soit leur apparition chez l'animal neuf. Ces anticorps ainsi produits s'effacent progressivement et, chez l'animal neuf, leur durée ne dépasse guère deux mois. Par cet artifice, un test peut être précocement positif chez la souris récemment infectée. Il disparaît ensuite (phase d'éclipse) pour réapparaître à la date habituellement observée dans la syphilis expérimentale de l'animal infecté.

La valeur antigénique de *Treponema pallidum* ultrasonné apparaît donc nettement supérieure à celle du tréponème de Reiter également ultrasonné. Elle la dépasse tout à la fois dans son emploi pour la réaction de fixation et par son pouvoir de provoquer des immobilisines chez un animal neuf.

Nos protocoles actuels mettent ainsi l'accent sur une propriété bien spéciale des tréponèmes pâles ultrasonnés. La mosaïque d'antigène du tréponème de culture de Reiter, si bien étudiée par l'école italienne, ne saurait donc être la représentation totale de la mosaïque propre au tréponème de la syphilis. L'assimilation entre ces deux antigènes est

contredite ici. Enfin nos expériences prouvent, par ailleurs et une fois de plus, que la réaction d'immobilisation est essentiellement un test d'antigénie.

RÉSUMÉ.

L'antigène du tréponème pâle ultrasonné utilisé dans les réactions de fixation est doué d'une plus grande sensibilité et spécificité que les antigènes lipidiques et même spirochéliens Reiter.

Mais les protocoles des auteurs montrent qu'il est capable d'autre part de provoquer, par injections répétées endoveineuses, soit la réapparition d'immobilisines disparues après thérapeutique, soit leur apparition chez un animal neuf, ce que l'on ne peut obtenir en utilisant l'antigène également ultrasonné de Reiter.

Ces expériences prouvent que la mosaïque d'antigènes du tréponème de culture ne saurait être la représentation totale de la mosaïque propre au tréponème de la syphilis.

SUMMARY

THE COMPORTMENT OF *Treponema pallidum* AFTER TREATMENT BY ULTRASONIC WAVES.

The *Treponema* antigen, after treatment by ultrasonic waves, shows in complement fixation reaction a greater sensibility and a greater specificity than the lipidic, or even Reiter's antigen.

Besides, it is able to induce, after repeated intravenous inoculations, either a reappearance of immobilisins which had disappeared after treatment, or their appearance in healthy animals, phenomena which never occur with Reiter's antigen treated by ultrasonic waves.

These experiments show that the mosaic of antigens in Reiter's *Treponema* does not correspond to the actual syphilis *Treponema* mosaic.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] GASTINEL (P.), COLLART (P.) et SAUSSE (A.). *Bull. Soc. Fr. Derm.*, 1951, **58**, 551. — GASTINEL (P.), COLLART (P.), SAUSSE (A.) et BOREL (J.-L.). *Bull. Soc. Fr. Derm.*, 1952, **59**, 50. — GASTINEL (P.), COLLART (P.) et BOREL (J.-L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 254. — GASTINEL (P.) et COLLART (P.). *Rapport*, in *T. P. I. Test de Nelson et les nouveaux aspects de l'immunologie de la syphilis*. Masson, édit., 1953. — GASTINEL (P.) et COLLART (P.). *Ann. Derm.*, 1956, **83**, 5.
- [2] Mc LEOD (CH. P.) et MAGNUSON (H. J.). *J. Vener. Dis. Inform.*, 1951, **32**, 274. — Mc LEOD (CH. P.) et MAGNUSON (H. J.). *Symposium of Washington*, 1^{er} mai 1952, *Ann. Soc. amer. Ven. Dis.*; *Amer. J. Syph.*, 1953, **37**, 9.
- [3] VAISMAN (A.), PRUDHOMME (R.) et HAMELIN (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 2750. — VAISMAN (A.), HAMELIN (A.) et PRUDHOMME (R.). *Ann. Derm.*, 1958, **85**, 642. — VAISMAN (A.) et HAMELIN (A.). *Presse méd.*, 30 août 1958, 1357.
- [4] GASTINEL (P.), COLLART (P.), VAISMAN (A.), HAMELIN (A.) et DUNOYER (F.). *Ann. Derm.*, 1958, **85**, 497.

VACCINATION CONTRE L'INFECTION CHARBONNEUSE PAR INJECTION DE BACTÉRIDIES TUÉES EN EXCIPIENT HUILEUX

PREMIÈRE NOTE

par H. JACOTOT et B. VIRAT.

(*Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale*)

On admet généralement que, contrairement à nombre de microbes pathogènes, les bactériidies charbonneuses tuées sont impropres à induire l'immunité ; en d'autres termes, il s'est avéré impossible, jusqu'à présent, de déceler dans le corps microbien tué de *B. anthracis* la présence d'un antigène vaccinant.

Toutefois, des travaux de Toussaint, puis Chamberland et Roux, Bail, Gladstone, Belton et Strange, et enfin Wright, qui réussirent à protéger les petits animaux de laboratoire avec des filtrats de sang charbonneux, d'œdème local, de cultures en milieux naturels, semi-synthétiques ou synthétiques, on pouvait conclure à la libération par le microbe d'un facteur immunisant. En outre, les recherches de Marmier et de Moulin, celles de Cromartie, A. M. Staub, Smith et Keppie, ont établi que *B. anthracis* était apte à sécréter une toxine. Enfin, Ramon, Boivin et Richou ont obtenu l'immunisation de cobayes, lapins et moutons au moyen d'anacultures totales contenant, à titre d'adjuvants, de la gélose et de l'alun.

Nous nous sommes proposé de rechercher si l'incorporation des bacilles tués à un adjuvant puissant ne permettrait pas d'exalter, pour le mettre en évidence, un pouvoir immunigène que l'on ne peut habituellement détecter dans le corps microbien, quel que soit d'ailleurs son substrat.

Nous avons utilisé pour ces essais deux souches de bactériidies acapsulées, donc avirulentes, l'une de Sterne que nous appellerons VCSA, l'autre de Staub, préparée selon la technique de Stamatin, appelée $\gamma 7$, et deux souches de bactériidies capsulées et virulentes, que nous désignons par les lettres M et F. Les cultures en bouillon de 20 à 24 heures, riches en bâtonnets, étaient d'abord additionnées de formol dans la proportion de 5 p. 1 000 ; après quarante-huit heures d'étuve à 37°, leur stérilisation étant acquise et contrôlée par ensemencement, on les centrifugeait ; les culots étaient alors remis en suspension, partie dans l'excipient huileux, partie dans l'eau physiologique.

Nous avons choisi comme adjuvant une huile de paraffine légère, la mayoline 2214, avec, comme stabilisant de l'émulsion, un « mannide monooleate », l'arlacel A, à raison de 1 partie d'arlacel pour 8 de mayoline ; le culot microbien était repris dans un volume de ce mélange tel que la teneur en bactériidies fût, finalement, le double de celle de la culture d'origine.

Les expériences rapportées dans cette première note ont été faites

sur des lapins. Chaque animal recevait deux fois 1 ml de suspension microbienne, à quinze jours d'intervalle, par voie sous-cutanée ; l'épreuve ultérieure consistait en une inoculation de spores d'une souche pathogène, chaque animal recevant dans le derme 10 000 spores.

A titre comparatif, nous avons immunisé un certain nombre de lapins avec des suspensions de spores de la souche acapsulée VCSA additionnées de bichlorhydrate de quinine ; ce vaccin vivant était injecté en une

N° de l'essai	CORPS MICROBIENS TUES								VACCINS VIVANTS			TEMPS
	Souches acapsulées				Souches capsulées				VCSA avec quinine	VCSA sans quinine	Y 7 sans quinine	
	VCSA en excip. huileux	VCSA en eau physiolo.	Y 7 en excip. huileux	Y 7 en eau physiolo.	M. en excip. huileux	M. en eau physiolo.	F. en excip. huileux	F. en eau physiolo.				
I	0 mort 4j	mort 4j mort 2j			+++ mort 7j	mort 4j mort 3j			0 0			mort mort
II	0 + +	mort 4j mort 4j mort 3j			mort 6j mort 5j mort 4j	mort 6j mort 4j mort 3j			0 + mort 3j			mort mort mort
III	++ ++++ mort 7j mort 5j mort 4j mort 3j mort 2j	mort 5j mort 4j mort 4j mort 4j mort 3j mort 3j							0 0 0 0 0 +++ mort 4j			mort mort
IV			0 0 0 mort 10j mort 7j mort 5j mort 4j	+ mort 10j mort 2j mort 2j			0 0 0 mort 6j mort 5j mort 5j mort 4j	mort 5j mort 4j mort 4j mort 3j			mort 4j mort 4j mort 3j mort 3j mort 3j mort 2j	mort mort mort mort mort mort
V	0 0 0 0 0 0 + ++ ++ ++ +++			0 mort 6j mort 4j mort 3j mort 2j			0 + ++ mort 8j mort 4j			mort 6j mort 6j mort 4j mort 4j mort 4j mort 3j		mort mort mort mort mort
VI					0 ++ mort 7j mort 6j mort 6j mort 5j mort 5j	mort 4j mort 4j mort 3j mort 3j						mort mort
Survies	18/24	0/12	3/7	2/3	3/12	0/9	7/14	0/4	10/12	0/6	0/6	0/1

Les signes 0, +, ++, etc. expriment l'intensité de la réaction locale après inoculation d'épreuve.

fois, sous la peau, à la dose de 0,25 ml, représentant $3,5 \times 10^6$ spores.

Ces divers essais ont été groupés dans le tableau ci-joint. Nous ajoutons que 8 lapins qui avaient reçu le mélange mayoline-arlacel seul, sans corps microbiens, ont manifesté, lors de l'épreuve virulente, la

même sensibilité que les témoins et sont morts dans les mêmes délais qu'eux.

De l'examen de ce tableau se dégagent quelques notions.

A. SUSPENSIONS MICROBIENNES SANS ADJUVANT. — 1° Les bactériidies capsulées tuées des deux souches employées mises en suspension dans de l'eau physiologique n'ont protégé aucun lapin contre l'inoculation d'épreuve, et les animaux qui les avaient reçues sont morts dans des délais ne différant pas sensiblement de ceux des témoins.

2° Les bactériidies acapsulées de la souche VCSA, semblablement traitées, se sont comportées de la même façon. Au contraire, les bactériidies acapsulées de la souche $\gamma 7$ ont immunisé 2 lapins sur 9 et la mort a été retardée chez l'un des autres.

B. SUSPENSIONS MICROBIENNES AVEC ADJUVANT HUILEUX. — 1° Les bactériidies capsulées tuées incorporées à l'excipient huileux ont protégé, ensemble, 10 lapins sur 26, et la mort s'est produite avec un certain retard chez plusieurs des autres.

2° Les bactériidies acapsulées tuées incorporées à l'excipient huileux ont protégé, ensemble, 21 lapins sur 31 et retardé la mort de plusieurs sujets.

3° A titre comparatif, les spores vivantes de bactériidies acapsulées additionnées d'un adjuvant ont immunisé 10 lapins sur 12 ; non additionnées d'adjuvant elles n'ont protégé aucun animal sur 12, retardant tout de même la mort de deux ou trois jours chez quelques-uns.

Il apparaît ainsi qu'il existe dans le corps microbien de *B. anthracis* un facteur vaccinant qui n'est pas altéré par le formol, que l'on décèle rarement dans les suspensions aqueuses de bactériidies tuées, mais que l'on met facilement en évidence dans les suspensions huileuses.

Il semble, en outre, que les bactériidies acapsulées se prêtent mieux que les bactériidies capsulées à la détection de ce facteur ; c'est du moins ce que suggèrent et les proportions de survies dans les deux groupes, et la constatation de deux survies parmi les lapins ayant reçu la souche $\gamma 7$ en suspension aqueuse.

Il est évident que la fraction vaccinnante révélée par l'adjuvant appartient en propre au corps microbien ; on peut se la représenter comme un antigène très labile, mais susceptible d'être stabilisé par le formol ; sa stabilisation serait moins satisfaisante dans les bactériidies pathogènes, parce que la présence d'une capsule, d'une structure périphérique particulière, y entraverait l'action du formol.

RÉSUMÉ. — Les bactériidies charbonneuses capsulées tuées par le formol sont impropres à induire l'immunité ; cette inaptitude est moins absolue chez les bactériidies acapsulées. Les unes et les autres, mais surtout les acapsulées, manifestent un pouvoir immunigène notable après incorporation à l'adjuvant puissant que constitue le mélange mayoline-arlacel. Ceci établit la présence dans le corps microbien même d'un facteur antigénique vaccinant, probablement fragile, et que le formol stabiliserait. La question se pose de savoir s'il existe quelque rapport entre cet antigène, l'antigène vaccinant que l'on peut, dans certaines conditions, extraire des filtrats, et la toxine sécrétée par le microbe.

SUMMARY

IMMUNIZATION AGAINST ANTHRAX
BY INJECTION OF KILLED *Bacillus anthracis* IN OIL EXCIPIENT.

Capsulated *B. anthracis* when killed by formalin are unable to induce immunity. This inability is less marked in non capsulated germs. Both (but particularly non capsulated *B. anthracis*) possess a marked immunogenic capacity after addition of the mixture mayoline-arlacel, a potent adjuvant. These findings evidence the presence in the bacterial cell of an antigenic immunizing, probably unstable factor, which would be stabilized by formalin. The question must then be studied, whether a relationship exists between this antigen, the antigen which can, under certain conditions, be extracted from filtrates, and the toxin secreted by *B. anthracis*.

**CIRCONSTANCES D'ISOLEMENT
ET CARACTÈRES DES SOUCHES D'*E. COLI*
DES GASTRO-ENTÉRITES INFANTILES IDENTIFIÉES
AU VIETNAM**

DESCRIPTION D'UN NOUVEAU SÉROTYPE : 26 : B₆ : H₂

par L. CHAMBON, L. LE MINOR et P. NICOLLE.

(Instituts Pasteur de Saigon et de Paris)

C'est en 1953 que nous avons commencé la recherche des colibacilles des G. E. I. au Sud-Vietnam. Une première enquête portant sur 330 échantillons de selles a donné des résultats négatifs, mais la positivité de quelques séro-diagnostic faisait soupçonner la présence des trois groupes sérologiques classiques, en particulier du groupe 26 : B₆ (Chambon [3]).

Poursuivant cette étude, Nguyen Van Ai [6] a isolé de 254 coprocultures une souche de 26 : B₆ lysotype Birmingham, une souche de 111 : B₄ lysotype Tourcoing et une souche de 55 : B₅ lysotype Béthune. Au cours des années 1957-1958 et des quatre premiers mois de l'année 1959, dix-sept autres souches d'*E. coli* pathogènes ont été identifiées au Sud-Vietnam. A Hanoï (Nord-Vietnam), Kirsche [4] a signalé la présence des sérotypes 111 : B₄ et 26 : B₆ lysotype Warwick et à Dalat. Capponi [4] a isolé sept souches de 26 : B₆ lysotype Warwick.

Nous donnons ici les résultats de l'étude des vingt souches isolées au Sud-Vietnam.

CARACTÈRES SÉROLOGIQUES, LYSOTIPIQUES ET BIOCHIMIQUES. — Ces vingt souches ont fait l'objet d'une investigation complète au point de vue de leurs caractères sérologiques et lysotypiques. Nous avons également

effectué la réaction à l'acide β -phényl-propionique (APP) et recherché la présence d'une lysine-décarboxylase (LDC). Les résultats obtenus, inscrits sur le tableau I, peuvent ainsi être comparés à ceux de Le Minor et coll. [5].

1° *Groupe sérologique 111 : B4*. — Sur cinq souches isolées, deux sont du lysotype Tourcoing et trois du lysotype Sèvres. La réaction à l'APP est positive et la réaction LDC également.

2° *Groupe sérologique 26 : B6*. — Deux souches appartiennent l'une au lysotype Birmingham, l'autre au lysotype Warwick.

Un nouveau sérotype possédant l'antigène flagellaire H2 a été isolé des selles d'un enfant de 10 mois atteint d'un syndrome diarrhéique. Les caractères biochimiques de cette souche sont les suivants :

a) Test de Braun et réaction à l'APP négatifs, absence de lysine-décarboxylase et d'uréase ; production d'indole positive et d'H₂S négative ; réaction au rouge de méthyle positive et réaction de Voges-Proskauer négative.

b) Non-utilisation du citrate de Na et du D-tartrate de Na.

c) Action sur les glucides :

Xylose	+ 1	Dulcitol	—
Arabinose ...	+ 1	Lactose	+ 1
Adonitol	—	Maltose	+ 1
Rhamnose ...	—	Saccharose	—
Glucose	+ 1 G	Tréhalose	+ 1
Mannitol	+ 1	Inositol	—
Sorbose	- 1	Salicine	- 1
Sorbitol	- 1		

3° *Groupe sérologique 55 : B5*. — Trois souches possèdent l'antigène flagellaire H2 : B5 et appartiennent au lysotype Béthune ; l'absence de lysine-décarboxylase chez deux d'entre elles les différencie de celles étudiées par Le Minor (*loc. cit.*). Quatre autres, pourvues de l'antigène flagellaire H7, lysotype Weiler, sont LDC positives. Le lysotype St-Christophers, qui paraissait jusqu'ici cantonné à la Grande-Bretagne, est

TABLEAU I. — Propriétés des vingt souches d'*E. coli* pathogènes isolées au Sud-Vietnam.

NOMBRE de SOUCHES	SEROTYPES	LYSOTYPES	A.P.P.	L.D.C.
5	111:B4	Tourcoing :2	+	+
		Sèvres :3	+	+
3	25:B6	Birmingham :1	0	+
		Warwick :1	0	+
	26:B6:H2	Nouveau lysotype	0	+
12	55:B5:H21	Béthune :1	0	+
		:2	0	0
	55:B5:H7	Weiler :4	0	+
	55:B5:H2	St-Christophers:5	+	+

A.P.P. : Réaction à l'acide β -phényl-propionique.

L.D.C. : Lysine-décarboxylase.

représenté par cinq cultures caractérisées par la présence de l'antigène flagellaire H2 et par la positivité de la réaction à l'APP et de la réaction LDC.

SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES. — La sensibilité aux antibiotiques de ces vingt souches a été étudiée par la technique des disques, comparativement à celle de la souche staphylocoque Londres. Nous avons considéré comme sensibles les souches inhibées par des quantités d'antibiotiques inférieures à 60 µg/ml (Chabbert et coll. [2]).

Vingt souches sont sensibles à la framycétine et à la néomycine et résistantes aux antibiotiques suivants : pénicilline, auréomycine, terramycine, tétracycline, bacitracine, érythromycine, carbomycine et spiramycine.

Quinze souches sont sensibles à la streptomycine, parmi lesquelles sept sont résistantes au chloramphénicol (quatre 111 : B4 et trois 55 : B5).

Cinq souches sont résistantes à la fois à la streptomycine et au chloramphénicol (deux 111 : B4 et trois 55 : B5).

CIRCONSTANCES D'ISOLEMENT. — Les vingt souches d'*E. coli* des gastro-entérites infantiles que nous venons d'étudier ont été isolées au cours de syndromes diarrhéiques sans atteinte profonde de l'état général ni déshydratation mais, dans quelques cas, avec vomissements et fièvre ; les selles contenaient rarement des éléments figurés du sang ; dans un cas cependant il s'est agi d'un syndrome dysentérique où la même coproculture donna une culture de *Sh. flexneri* II et une culture d'*E. coli* 111 : B4. Ces cas de diarrhée sporadiques furent marqués par une légère recrudescence pendant les mois frais de l'année (décembre à mars) ; à notre connaissance, ils n'ont pas donné lieu à des épidémies.

Calculé sur 1 680 coprocultures pratiquées chez des enfants d'un âge inférieur à 10 ans, le pourcentage de positivité est de 1,2. Il est plus élevé chez les enfants âgés de quelques mois à un an d'où proviennent les vingt souches isolées, mais il demeure inférieur à celui des salmonelloses et surtout des shigelloses.

CONCLUSION ET RÉSUMÉ. — Dans les conditions de notre enquête, l'incidence des *E. coli* pathogènes dans l'étiologie des syndromes diarrhéiques de l'enfant paraît faible au Vietnam. Sur vingt souches isolées, cinq appartiennent au groupe 111 : B4, trois au groupe 26 : B6 et douze au groupe 55 : B5. Leurs propriétés sérologiques, lysotypiques et biochimiques sont conformes aux données classiques, sauf pour un nouveau sérotype dont la formule antigénique est 26 : B6 : H2, et pour deux souches 55 : B5 : H21 lysotype Béthune dont la réaction LDC est négative. Cinq souches du groupe 111 : B4 appartiennent au lysotype St-Christophers.

SUMMARY

ISOLATION CIRCUMSTANCES AND CHARACTERISTICS OF *E. coli*
STRAINS ISOLATED FROM INFANTILE GASTRO-ENTERITIS IN VIETNAM.
DESCRIPTION OF A NEW SEROTYPE 26 : B6 : H2.

The role played by pathological *E. coli* in the etiology of diarrheic syndroms in children is not important in Vietnam. Among twenty strains isolated, five belong to group 111 : B4, three to group 26 : B6,

and twelve to group 55 : B5. Their serological, phage-type and biochemical properties are the classical ones, except for the new serotype the antigenic formula of which is 26 : B6 : H2, and for two strains 55 : B5 : H21 Bethune phage-type with a negative lysine-decarboxylase reaction. Five strains of group 111 : B4 belong to the St-Christophers phage-type.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CAPPONI (M.). *Rapport annuel Inst. Pasteur de Dalat*, 1956.
- [2] CHABBERT (Y.), LE MINOR (L.) et NICOLLE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, 87, 175.
- [3] CHAMBON (L.). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1955, 48, 296.
- [4] KIRSCH (P.). (Communic. à la Soc. Franco-Viet, de Biol., Hanoï, Février 1954).
- [5] LE MINOR (L.), LE MINOR (S.) et NICOLLE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 786.
- [6] NGUYEN VAN AI. *Rapp. ann. Fonct. tech. Inst. Pasteur, Saigon*, 1956, 14.

A PROPOS DES NOUVELLES COLORATIONS DES BACILLES TUBERCULEUX A LA FUCHSINE BASIQUE A FROID, EN PRÉSENCE DE CORPS TENSIO-ACTIFS

par Jean DESBORDES et Etienne FOURNIER.

(Laboratoire National de la Santé publique, 25, bd Saint-Jacques, Paris)

Nous avons proposé en 1951 [7] d'étendre l'application des propriétés de certains corps tensio-actifs à l'ancienne coloration classique de Ziehl, qui de ce fait permet la coloration à froid des bacilles tuberculeux. Nous proposons la préparation d'une solution de fuchsine tensio-active, en ajoutant un corps tensio-actif à la dose de X gouttes pour 100 cm³ de solution de fuchsine basique à 12 p. 1 000, phéniquée à 36 p. 1 000 [6].

Nous avons insisté à différentes reprises sur le choix « judicieux » du tensio-actif, tous les corps ne nous semblant pas automatiquement utilisables. Cependant à l'époque nous n'avions pas suffisamment d'arguments expérimentaux pour permettre *a priori* un choix préalable du corps tensio-actif. En fait, les meilleurs résultats étaient obtenus avec des mélanges industriels complexes [8].

Depuis, nous avons étudié systématiquement l'action des corps tensio-actifs classés suivant leurs propriétés physico-chimiques classiques : anionique, cationique, non ionique, et, en accord avec Nakabayashi [10], nous avons observé une différence en faveur des corps anioniques et non anioniques, les dérivés cationiques étant à exclure.

Il est donc tout à fait explicable que certains expérimentateurs, qui ont utilisé des corps cationiques, n'aient pas obtenu satisfaction avec cette coloration à froid (par exemple avec les ammoniums quaternaires, le cétalpyridium, le cétavlon, l'antarox A 400, etc.) Lorsque l'on obtient des résultats favorables avec de tels produits, c'est qu'il s'agit de corps

impurs contenant des substances non ioniques, confirmant l'observation récente de Coletsos [4] sur le fait que les tensio-actifs « exposent à des aléas imprévisibles du fait que leurs propriétés physico-chimiques ne sont pas rigoureusement définies et varient très sensiblement d'un échantillon à l'autre », ce qui doit inciter les bactériologistes à exiger pour ces corps, *comme pour les colorants*, des produits extrêmement purs.

Dans le tableau I, nous avons relevé les résultats obtenus avec les détergents des trois séries, et ceci nous semble particulièrement démonstratif.

TABLEAU I. — Intensité de la coloration de Ziehl, appréciée de 0 à 5, obtenue après coloration à froid. Fuchsine tensio-active sans recoloration au bleu de méthylène.

Qualité du Tensio-actif utilisé	0 minute	3 minutes	6 minutes
<u>anionique</u>			
ester sulfurique d'alcool aliphatique	0	4-5	5
<u>anionique</u>			
Igepal	0	4-5	5
<u>non anionique</u>			
polyéthylèneglycols	0	5	5
<u>cationique</u>			
Ammonium quaternaire	0	2	2
<u>cationique</u>			
cetylpyridium	0	2	2

Echelle de coloration : 0 = néant ; 2 = rose ; 4 = rouge ; 5 = rouge intense.

ERRATUM : 1^{re} colonne, 6^e ligne. *Au lieu de* : non anionique, *lire* : non ionique.

En réalité, si l'on observe scrupuleusement certains impératifs, cette coloration à froid doit donner entière satisfaction.

1° On ne doit utiliser que des corps tensio-actifs anioniques (esters sulfuriques d'alcools aliphatiques, tétradécylsulfate de sodium, teepol, igeal, lavassol, etc.), ou non ioniques (polyéthylène-glycols, polyéthylène-alkylaryl, Tweens divers, etc.).

2° La dose des corps tensio-actifs doit être *très faible* (de 0,10 à 0,01 p. 100), soit pratiquement X gouttes du corps pur liquide pour

100 cm³ de fuchsine alcaline phéniquée, une trop grande concentration aboutissant à la *décoloration* (germes faussement colorés en bleu) par suite de l'attaque de la couche cireuse du bacille.

3° Le contact entre le mélange proposé (fuchsine tensio-active) et la Mycobactérie doit être soigneusement minuté (entre trois et cinq minutes pour la concentration proposée de X gouttes p. 100), un trop long contact entraînant une attaque de la couche cireuse.

4° Le pH doit être en zone légèrement acide (obtenu avec 12 g d'acide phénique pour 300 cm³ de la solution de fuchsine alcaline), un pH mal étudié conduisant à de mauvais résultats.

5° La fuchsine doit être basique, la coloration ne donnant pas de résultat avec des colorants acides.

Nous pouvons proposer une explication fort simple de l'exclusion des tensio-actif cationiques. Ceux-ci salifient les groupements électro-positifs (COOH++) des acides mycoliques spécifiques des zones sélectives de fixation des colorants basiques. Ce phénomène est inhibé par compétition directe.

Par contre, les autres détergents à radical acide ou neutre laissent libres les mêmes groupes polaires (COOH++), ce qui favorise la fixation du colorant.

En conclusion, il n'est pas sans inconvénient d'utiliser n'importe quel tensio-actif [2 et 3] au cours des manipulations sur les Mycobactéries (et cette remarque est valable pour toutes les opérations [11 à 14], y compris les techniques d'homogénéisation). En matière de coloration à froid [1 à 9] (technique du Ziehl tensio-actif à froid) en particulier, il faut éliminer les corps cationiques. La technique que nous avons proposée ici même en 1952 [5] doit être complétée dans ce sens.

SUMMARY

THE NEW STAINING METHODS OF TUBERCLE BACILLI BY MEANS OF BASIC FUCHSIN AT LOW TEMPERATURE, IN PRESENCE OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES.

Surface-active substances must be carefully chosen [2, 3] for the study of Mycobacteria. This remark applies to all the operations [11 to 14], homogeneisation technique included. When staining at low temperature [1 to 9], cationic substances must never be used.

The authors' technique described in 1952 [5] must be completed according to these considerations.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUBERT (E.). *Canadian J. publ. Hlth.*, 1950, **41**, 31.
- [2] BAKER (Z.) et coll. *J. exp. Med.*, 1941, **74**, 611.
- [3] BOLLE (A.). *Schweiz. Z. allg. Path.*, 1958, **21**, 714.
- [4] COLETOS et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 507.
- [5] DESBORDES (J.) et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 268.
- [6] DESBORDES (J.) et coll. *Ann. Ph. Fr.*, 1952, **40**, 441.

- [7] DESBORDES (J.) et coll. *Ann. Biol. clin.*, 1951, 9, 151.
 - [8] DESBORDES (J.). *Ann. Ph. Fr.*, 1954, 12, 361.
 - [9] GRUNLAND et LUZZATI. *C. R. soc. Biol.*, 1949, 183, 981.
 - [10] NAKABAYASHI. *Kekkaku*, 1956, 31, 471.
 - [11] PETHICO (B. A.). *Trans. Farad. Soc.*, 1955, 51, 1402.
 - [12] SALTON (M. R. J.). *J. gen. Microb.*, 1951, 5, 391.
 - [13] SCHULMAN (J. H.) et coll. *Proc. Roy. Soc. (B)*, 1937, 122, 29.
 - [14] RANDOLPH (T. G.) et coll. *Amer. Rev. Tub.*, 1944, 49, 109.
-

PASTEURISATION DU LAIT ET DESTRUCTION DES SHIGELLES

par A. NÉVOT, P. LAFONT et J. LAFONT.

(Laboratoire d'Hygiène alimentaire de la Faculté de Médecine de Paris)

Dans un ensemble de travaux antérieurement publiés [1], nous avons rapporté les résultats d'expériences précisant le degré de thermorésistance de la plupart des espèces bactériennes pathogènes pour l'homme, et nous avons montré qu'un traitement de pasteurisation du lait correctement effectué détruisait dans leur vitalité les germes appartenant à ces espèces. Nous n'avons pas alors cru utile de faire porter nos investigations sur le genre *Shigella*, n'ayant pas connaissance de relations de travaux rapportant qu'un lait ayant subi un traitement industriel de pasteurisation ait pu être incriminé comme étant à l'origine d'une épidémie d'affections dysentériques. Depuis, la lecture d'un article publié par Gaase et Ende [2] nous a incités à faire une étude de la thermorésistance des shigelles.

Gaase et Ende signalent une épidémie due à *Shigella sonnei*, survenue à Bochum en 1955, ayant atteint 3 000 personnes, en particulier des enfants d'écoles consommateurs de lait additionné de cacao. Les bacilles de Sonne ayant pu être apportés par la poudre de cacao ou par le lait, les auteurs ont recherché la thermorésistance de ce germe ; sans préciser leur protocole expérimental, ils écrivent que le bacille de Sonne peut supporter un chauffage de 85° C pendant dix secondes dans le lait entier et de 85° C pendant six secondes dans le lait écrémé.

SENSIBILITÉ A LA CHALEUR DES SHIGELLES. — Pour effectuer cette étude nous avons adopté le même protocole expérimental que lors de nos essais antérieurs portant sur d'autres espèces bactériennes [1] :

1° Introduction au temps 0 de 0,1 ml de la suspension bactérienne dans un tube en verre d'un diamètre de 11 mm, lui-même placé dans un bain-marie, et contenant 1,9 ml de liquide préchauffé, ce liquide étant soit de l'eau physiologique, soit du lait entier préalablement stérilisé, soit du lait entier cru, soit du lait écrémé cru.

2° Après un laps de temps déterminé, les germes sont soustraits à l'action de la chaleur par adjonction rapide dans le tube de 2 ml

d'eau physiologique froide ; 2 ml du mélange ainsi obtenu sont aspirés immédiatement et servent à effectuer la recherche des bactéries survivantes. Pour ce faire les ensemencements ont été pratiqués, suivant la nature de la phase dispersante, soit en bouillon nutritif, soit sur milieu E. M. B. et S. S. ; le volume des inoculums employés a été tel que la recherche des germes survivants a toujours correspondu à des populations bactériennes initiales d'au moins 1.10^6 germes.

Nous avons utilisé, dans notre expérimentation, une souche de *S. dysenteriae*, deux souches de *S. flexneri* et deux souches de *S. sonnei* (1).

Les résultats que nous avons obtenus sont rapportés dans le tableau I. Ils montrent que, parmi les trois espèces, *S. sonnei* présente la résistance à la chaleur la plus grande. Ses suspensions en eau physiologique sont, pour les températures de chauffage les plus basses, plus facilement inactivées que les suspensions en lait ; par contre, entre suspensions en lait entier et en lait écrémé, aucune différence significative n'a été décelée.

TABLEAU I.

TEMPÉRATURE de CHAUFFAGE	DURÉES des CHAUFFAGES ASSURANT la DESTRUCTION de :		
	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. flexneri</i>
EN EAU PHYSIOLOGIQUE			
62°	1 min. 15 sec.	2 min. ± 5 sec.	2 min. ± 5 sec.
67°	20 sec.	25 sec.	25 sec.
70°	9 à 10 sec.	15 sec.	12 à 15 sec.
72°	7 à 8 sec.	10 à 12 sec.	10 à 12 sec.
75°	7 sec.	7 à 8 sec.	7 à 8 sec.
EN LAIT ENTIER STÉRILE			
62°	4 min.	5 min. 45 sec à 6 min.	4 min. ± 10 sec.
67°	30 sec.	35 à 40 sec.	35 à 40 sec.
70°		12 sec.	11 à 12 sec.
72°	8 à 10 sec.	8 à 10 sec.	9 sec.
75°	6 sec.	6 à 7 sec.	6 sec.
EN LAIT CRU			
62°	4 min.	5 min. 45 sec.	4 min. 30 sec.
67°	30 sec.	35 sec.	35 à 40 sec.
70°	10 sec.	12 à 13 sec.	12 sec.
72°	8 sec.	9 sec.	8 sec.
75°	5 sec.	6 sec.	6 sec.
EN LAIT ECRÉMÉ			
62°	4 min. ± 20 sec.	5 min. 30 sec.	4 min. ± 10 sec.
70°	10 sec.	13 à 15 sec.	10 à 12 sec.
72°	9 sec.	10 sec.	10 sec.
76°	5 sec.	5 à 6 sec.	5 à 6 sec.

PASTEURISATION DU LAIT ET DESTRUCTION DES SHIGELLES. — En raison de difficultés matérielles nous n'avons pas procédé à des essais de chauffage de lait pollué par des shigelles dans un appareil de pasteurisation

(1) Nous remercions le Dr Thibault, Chef de Service à l'Institut Pasteur, d'avoir eu l'amabilité de mettre ces souches à notre disposition.

de type industriel. Nous estimons d'ailleurs que pour juger de l'efficacité de la pasteurisation du lait en matière de destruction des shigelles, la mise en œuvre de tels essais est superflue, eu égard aux considérations suivantes :

1° Les expériences de chauffage ayant été conduites dans des conditions techniques rigoureusement identiques, nous pouvons établir une comparaison entre thermorésistance des shigelles et thermorésistance d'espèces bactériennes pathogènes que nous avons antérieurement

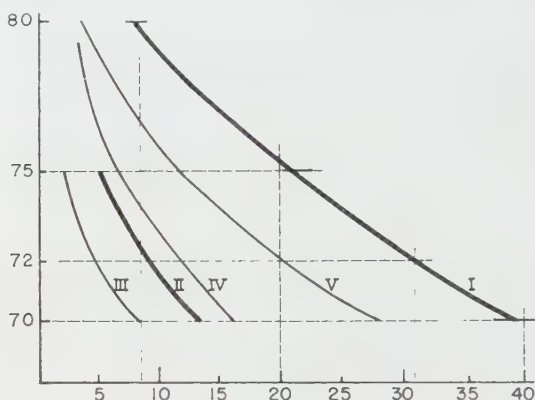


FIG. 1. — I, inactivation de la phosphatase. II, destruction de *Shigella sonnei*. III, destruction des bacilles typhiques. IV, destruction des bacilles tuberculeux bovins. V, destruction des brucelles.

étudiées. Sur la figure 1 sont tracées, d'une part les courbes de destruction par la chaleur du bacille de Sonne en fonction des valeurs numériques rapportées ci-dessus, d'autre part les courbes concernant les salmonelles, les brucelles et le bacille tuberculeux. Il ressort que ces deux dernières espèces bactériennes sont plus résistantes à la chaleur que les bacilles de Sonne ; or nous avons démontré que, dans le cas de chauffage du lait dans un appareil de type industriel, une opération de pasteurisation correctement effectuée assure certainement la destruction des brucelles et des bacilles tuberculeux.

2° L'inactivation de la phosphatase alcaline, base d'appréciation de la valeur du traitement thermique auquel a été soumis un lait pasteurisé, n'a lieu que pour des chauffages très nettement supérieurs à ceux permettant de tuer les shigelles.

3° En cas de pasteurisation basse, le chauffage à 62° C pendant trente minutes confère une énorme marge de sécurité quant à la destruction du bacille de Sonne. Pour en juger il suffit de se rapporter aux valeurs numériques figurant dans le tableau I.

En conclusion, on peut affirmer qu'un lait entier ou écrémé, qui a subi un traitement thermique ayant provoqué l'inactivation de la phosphatase alcaline, ne peut contenir, au sortir de l'appareil de pasteurisation, de shigelles vivantes.

RÉSUMÉ. — Des essais expérimentaux montrent qu'une pasteurisation du lait correctement effectuée, qu'elle soit du type H. T. S. T. ou du type « pasteurisation basse », assure la destruction de *Shigella dysenteriae*, de *S. flexneri* et de *S. sonnei*.

SUMMARY

THE DESTRUCTION OF *Shigella* IN MILK BY PASTEURIZATION.

Shigella dysenteriae, *Sh. flexneri* and *Sh. sonnei* are destroyed by pasteurization when correctly carried out.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] NÉVOT (A.), LAFONT (P.) et LAFONT (J.). *De la destruction des bactéries par la chaleur. Etude de l'efficacité de la pasteurisation du lait.* Monographie de l'Institut National d'Hygiène, Paris 1958.
[2] GAASE (A.) et ENDE (R.). *Arch. Hyg.*, 1956, **140**, 403.

LE TITRAGE DES SÉRUMS ANTIVENIMEUX

I. — L'EFFET CYTOTOXIQUE DES VENINS DE VIPÈRE (*V. ASPIS*) POUR LES CELLULES DE SOUCHE KB.

SA NEUTRALISATION PAR LES SÉRUMS ANTIVENIMEUX HOMOLOGUES

par R. LAMY, F. ROGER et A. ROGER.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches,
et Service des Virus [D^r P. LÉPINE])

Les titrages sur animaux, même réalisés sur des individus de race pure, ont en commun le désavantage de s'adresser à des populations de sensibilité relativement peu homogène.

La réponse des animaux varie en effet notablement d'un individu à l'autre, ce qui oblige, en définitive, à étudier chaque concentration du produit soumis au titrage sur un échantillonnage assez nombreux pour être réellement représentatif.

Si le nombre des animaux est trop petit, les variations individuelles prennent évidemment la première place dans les résultats que l'on enregistre et la précision finale reste toujours des plus médiocres.

Si, au contraire, on veut employer un nombre élevé d'individus, on rencontre aussitôt des limitations d'ordre pratique qui tiennent surtout au prix de revient de la méthode et aux manipulations qu'elle entraîne.

Assez souvent même, le nombre des animaux utilisables est limité dès l'origine par la petite quantité de produits à titrer dont on dispose.

Dans ces conditions, les titrages *in vivo* constituent ordinairement des sortes de compromis et sont effectués sur un échantillonnage suffisant pour donner une idée approximative de la valeur des produits biologiques, mais sans que l'on ait réellement le droit de parler d'une véritable mesure.

Les titrages *in vitro* sur cellules de souche qui utilisent toujours une

moins grande quantité de substance à tester s'effectuent, en revanche, sur des populations cellulaires nombreuses, faciles à obtenir et à manipuler, peu coûteuses et d'une très grande homogénéité. Ils échappent ainsi aux servitudes et aux limites des titrages sur animal et permettent, pour un prix de revient suffisamment bas, d'allier la précision des mesures à la simplicité de la technique.

Ce raisonnement très général peut évidemment s'appliquer au titrage biologique des venins de vipère et à l'évaluation des sérums antivenimeux, à la double condition bien entendu que les venins exercent un effet cytotoxique sur les cultures cellulaires et que cet effet soit neutralisable par les sérums antivenimeux homologues.

Nous verrons précisément que tel est bien le cas avec les cellules de la souche KB.

TECHNIQUE. — Nous avons utilisé les cellules de la souche KB de Eagle entretenues au Laboratoire en croissance exponentielle continue au contact du verre dans des fioles pyrex de 1 litre, hermétiquement closes.

Le milieu d'entretien (dit « milieu au bicarbonate ») était constitué par une solution saline équilibrée de Earle tamponnée au bicarbonate et amenée à un pH de 7,4, enrichie par addition d'un hydrolysate de caséine, de glucose, de glutamine et vitamines [3 et 4] renfermant, en outre, une quantité appréciable de sérum de veau (16 %), de la pénicilline (200 U.O./ml), de la streptomycine (50 µg/ml) et un indicateur de pH (phénol-sulfone-phthaléine).

Pour l'étude de l'effet cytotoxique du venin, nous avons utilisé les cellules selon un processus assez voisin de celui employé pour le titrage des virus poliomyélitiques [5] : nous avons donc préparé par trypsination (selon le procédé de Dubelco et Vogt) [4] des suspensions de cellules à 50 000 cellules par ml (numération selon la technique de Sanford) [7], le milieu de suspension consistant également en un milieu à l'hydrolysate de caséine (dit « milieu au tris ») analogue au précédent, mais où l'on avait substitué au bicarbonate un tampon organique non volatil, le trishydroxyméthylaminométhane [2, 8], qui permet de travailler « à tube ouvert ».

Les suspensions cellulaires ont été distribuées dans des tubes de Kahn de 13 mm de diamètre, maintenus verticaux et stationnaires pendant toute la durée de la culture et des titrages (à raison de 0,5 ml par tube).

Après avoir été recouverts d'une feuille de papier d'aluminium stérilisée par flambage, les portoirs des tubes de Kahn ont été portés pendant quarante-huit heures à 37° C, c'est-à-dire jusqu'à formation d'un tapis épithélial continu dans le fond des tubes. On a alors ajouté dans chaque tube 0,5 ml de venin préalablement dilué, en utilisant 8 tubes de culture par dilution.

Toutes les dilutions de venin ont été faites extemporanément avant distribution à partir d'une solution-mère à 10 mg de venin sec par ml, préparée depuis moins de quatre jours et conservée à 4° C, et en utilisant comme solvant du milieu au tris *sans sérum* (de sorte que la concentration du sérum de veau dans le milieu s'est trouvée aux environs de 8 % pendant la seconde partie de la réaction).

Pour les essais de séro-neutralisation, nous avons remplacé le venin, utilisé seul jusque-là, par des mélanges de venin et de sérum, effectués à « sérum constant-venin variable » et préalablement incubés pendant vingt-quatre heures à 4° C (les sérums à étudier se trouvant dilués à 1/10 pendant le temps de contact des deux réactifs, les quantités de venin à neutraliser se trouvant elles-mêmes disposées selon une progression géométrique de raison 2 entre 8 mg et 3,8 µg)

RÉSULTATS. — Nous n'avons observé aucune contamination de nos cultures malgré la présence assez constante de bactéries dans le venin.

1° *Effet cytotoxique du venin.* — Les phénomènes évoluent très rapidement avec les fortes concentrations de venin, beaucoup plus lentement et plus progressivement avec les concentrations les plus faibles, ainsi que le tableau I (où l'on trouvera les résultats d'observations réalisées à des temps variables) permet immédiatement de s'en rendre compte.

Dès les premières heures, on assiste, en effet, au décollement d'ensemble de la coupole cellulaire avec les quantités de venin supérieures à 1 mg, les cellules décollées conservant encore un aspect presque normal.

Par la suite, les phénomènes de décollement progressent vers les dilutions de venin plus élevées : ils atteignent les tubes contenant 500 μg après vingt-quatre heures et touchent incomplètement ceux qui ne renferment que 250 μg , où l'on observe un véritable décollement intercellulaire très particulier, avec formation d'un réseau grossier à très larges mailles, constitué de boyaux cellulaires anastomosés.

Mais c'est après quatre jours seulement que les lésions sont les plus lisibles : tous les tubes contenant une quantité de venin supérieure à 31 μg renferment, en effet, à ce moment des massifs cellulaires décollés, volumineux et noirâtres.

Au-dessous de 15,5 μg , au contraire, les cellules, claires et bien collées, sont encore vivantes : on voit toutefois apparaître des espaces cellulaires arrondis qui trouent l'épithélium de place en place et sont assez nombreux dans les tubes correspondant à 15,5 et 7,7 μg , plus rares dans les tubes qui ne contiennent que 3,8 μg .

Les derniers tubes seuls (1,9 μg) sont absolument normaux et ne se distinguent en rien des tubes cellulaires témoins.

Au quatorzième jour, les tubes sont encore facilement lisibles et il n'y a plus de variation dans la limite de l'effet cytotoxique qui se maintient à 31 μg .

2° *Essais de séro-neutralisation.* — Nous avons prolongé les observations jusqu'au quatorzième jour de la culture, de façon à bien mettre en évidence l'efficacité de la séro-neutralisation en nous basant sur la protection définitive des cultures cellulaires et non sur un simple retard de l'effet cytotoxique éventuellement provoqué par les sérums antivenimeux.

Le tableau II, où l'on trouvera les résultats, montre une différence extrêmement nette entre le sérum des animaux neufs et celui des chevaux hyperimmunisés : la dose cytotoxique limite passe, en effet, de 31 μg en présence de sérum normal, à 250 et 125 μg respectivement pour les sérums antivenimeux 129 et 135.

Le pouvoir cytopathogène des venins de vipère pour les cellules de la souche KB est donc spécifiquement neutralisable.

RÉSUMÉ. — Le venin de vipère (*V. aspis*) exerce un effet cytotoxique tout à fait caractéristique sur les cellules de la souche KB.

Le phénomène est spécifiquement neutralisable, de sorte qu'il existe bien une réaction de séro-neutralisation du venin en culture cellulaire.

Cette réaction doit pouvoir être utilisée pour le titrage *in vitro* des sérums antivenimeux.

TABLEAU I. — Effet cytotoxique du venin de vipère pour les cellules de la souche KB (trois observations successives).

Quantité de venin par tube (en µg)	4000	2000	1000	500	250	125	62	31	15,5	7,7	3,8	1,9
Lecture à la 4ème heure (décollement massif de la cou- pole épithéliale)	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lecture à la 24ème heure (même cri- tère que ci-dessus)	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
Lecture au 4ème jour (amas noi- râtres et décollés)	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0

TABLEAU II. — Séronéutralisation spécifique du pouvoir cytotoxique du venin de vipère (lecture au quatorzième jour).

Quantité de venin par tube (en µg)	4000	2000	1000	500	250	125	62	31	15,5	7,7	3,8	1,9
Témoin venin ...	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
Sérum "normal" n° 4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
Sérum "normal" n° 10	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
Sérum antiveni- meux n° 129	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
Sérum antiveni- meux n° 135	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0

SUMMARY

TITRATION OF ANTI-VENOM SERA.

- I. — CYTOTOXIC EFFECT OF *Vipera aspis* VENOM ON KB CELLS.
ITS NEUTRALIZATION BY HOMOLOGOUS ANTI-VENOM SERA.

The venom of *V. aspis* has a characteristic cytotoxic effect upon KB cells.

The phenomenon can be neutralized by the specific immune serum ; a seroneutralization reaction of the venom can therefore be carried out in tissue culture. This reaction might be used for the titration of anti-venom sera.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DULBECCO (R.) et VOGT. *J. exp. Med.*, 1954 **99**, 165.
[2] GOMORI (G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1946, **62**, 33.
[3] LÉPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (P.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 654.
[4] LÉPINE (P.), DANIEL (P.), PELMONT (J.) et SLIZEWICZ (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 567.
[5] LÉPINE (P.), ROGER (F.) et ROGER (A.). *Bull. Org. Mond. Santé*, 1959, **20**, 563.
[6] ROGER (F.), LAMY (R.) et ROGER (A.). *Ann. Inst. Pasteur* (à paraître).
[7] SANFORD (K. K.), EARLE (W. R.), EVANS (V. S.), WALTZ (H. H.) et SHANNON (J. E.). *J. nat. Cancer Inst.*, 1951, **11**, 773.
[8] SWIM (H. E.) et PARKER (R. F.). *Science*, 1955, **122**, 466.

ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA RHIZOSPHERE DU BLÉ

III. NATURE DES EXCRÉTIONS RADICELLAIRES DU BLÉ A LA FIN DU TALLAGE

par J. RIVIÈRE (*).

(Institut National Agronomique, Laboratoire de Microbiologie)

Nous avons vu [1] que l'effet rhizosphère du blé atteignait son maximum au moment du tallage : en fait, c'était exactement à la fin du tallage, au début de la montée. Après avoir réalisé une rhizosphère artificielle [2], nous avons démontré que cet effet pouvait s'expliquer presque uniquement par l'action des sécrétions radicellaires (1).

Un certain nombre d'auteurs [3 à 8] ont étudié la composition bio-

(*) Nous remercions particulièrement MM. Adrian, C. N. R. S., Bellevue, Kogane, I. N. R. A. et Fauconneau, C. N. R. Z., Jouy-en-Josas, qui nous ont apporté toute leur aide amicale.

(1) Bien que l'on emploie indifféremment les deux termes pour désigner les diverses substances libérées par les racines au cours de la vie de la plante, il semble que le mot excrétiions soit le plus convenable, car il ne s'agit pas de substances liées à l'existence d'organes spécialisés.

chimique de ces excréments, sans toutefois toujours bien les séparer des processus liés au métabolisme de la germination et distincts de l'excrétion normale des racines de plantes plus âgées.

Le but du présent travail a été de déterminer la composition biochimique des excréments radicellaires du blé au moment du tallage.

TECHNIQUE. — Nous avons fait des cultures aseptiques du blé (var. *fyigia*) menées jusqu'à la fin du tallage dans des conditions expérimentales identiques à celles décrites dans notre précédente note [2].

Après contrôle de l'asepsie, les plantes sont enlevées, les racines lavées, l'eau de lavage et la solution nutritive de trente fioles mélangées et filtrées sur Seitz EK après avoir amené le pH à 6,0 avec $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$.

Une partie du mélange sert au dosage des acides volatils de la série grasse [9], le reste étant lyophilisé à -45°C . C'est dans le lyophilisat que nous avons recherché les acides organiques non volatils [10], les oses [11], les acides aminés et les amides [12], les nucléosides et les nucléotides [13] et certaines vitamines [14].

La détection des facteurs responsables de l'inhibition des bactéries cellulolytiques aérobies se fait en incorporant une certaine quantité du lyophilisat (0,5, 1 et 2 g) dans des plaques de silico-gel convenablement préparées pour l'étude de la microflore cellulolytique et en les ensemençant soit avec des souches pures (*Cytophaga rubra* et *Cellvibrio ochracea*) soit avec des grains de terre.

La comparaison se fait avec la solution nutritive minérale vierge incorporée dans les mêmes conditions.

RÉSULTATS. — Nous pouvons les résumer dans le tableau I.

Il y a en plus des traces de nucléotides, mais pas de vitamines du

TABLEAU I. — Constitution biochimique des excréments radicellaires du blé à la fin du tallage.

ACIDES GRAS VOLATILS	ACIDES ORGANIQUES NON VOLATILS	OSÉS	ACIDES AMINÉS ET AMIDES
Acétique: 13	Malique: 0,1	Glucose: 0,1	Ac. glutamique: 0,012
Propionique: 3,5	Lactique: traces	Arabinose: traces	Ac. cystéique: 0,005
Butyrique: 2	Tartrique: "	Xylose: "	Sérine: 0,007
Valériannique: 1,5	Citrique: "	Raffinose: "	Glycine: 0,005
	Succinique: "	Indéterminé: "	Asparagine: 0,011
	Fumarique: "		Thréonine: 0,010
	Glycolique: "		Alanine: 0,011
	Indéterminé: "		Glutamine: 0,013
			Ac. γ-aminobutyrique: 0,012
			Valine: 0,010
			Proline: 0,800
			Ac. hydroxypipécolique: 0,015

La teneur est exprimée en mg par litre de solution nutritive correspondant à une plante

groupe B. Nous n'avons jamais observé de ralentissement de la croissance des souches pures ensemençées sur silico-gel.

Par contre, les plaques ensemençées avec des grains de terre sont rapidement envahies par des champignons.

DISCUSSION. — Quand on réalise une culture aseptique du blé jusqu'à la fin du tallage dans les conditions expérimentales décrites précédemment [2], la limpidité absolue du milieu nutritif, l'état sanitaire parfait des racines permettent d'admettre, en première approximation, que seules les excréctions radicellaires sont recueillies après filtration. Leur étude biochimique montre qu'il y a un assez grand nombre de substances en quantité relativement plus importante que la bibliographie ne pouvait le laisser prévoir [3 à 8].

En effet, par plante, nous trouvons qu'il y a une libération de 20 mg d'acides gras volatils, d'environ 2 mg d'acides aminés, et de quelques dixièmes de milligramme d'oses et d'acides organiques, accompagnés de traces de nucléotides.

En fait les substances excrétées par les racines du blé au moment du tallage présentent une certaine analogie avec ce que l'on sait du métabolisme de la plante à ce stade [15, 16, 17] : parmi les acides organiques, le groupe le plus important est celui du cycle citrique et, dans celui-ci, l'acide malique en quantité notable ; parmi les acides aminés et les amides, l'acide glutamique, l'asparagine, la glutamine, l'alanine et l'acide γ -amino-butyrrique ; parmi les oses, le glucose et le raffinose. L'inhibition des bactéries cellulolytiques aérobies que l'on observe dans la rhizosphère proche au moment du tallage semble être due à l'envahissement par des champignons appartenant à des espèces variées [1, 2], favorisés par l'excrétion abondante d'acides organiques et l'apport d'aliments facilement métabolisables contenus dans le lyophilisat.

RÉSUMÉ.

Le but de ce travail est de déterminer la composition biochimique des excréctions radicellaires du blé, var. *fylgia*, cultivé aseptiquement jusqu'à la fin du tallage. Par plante, il y a 20 mg d'acides gras volatils, 2 mg d'acides aminés et quelques dixièmes de milligramme d'oses et d'acides organiques, accompagnés de traces de nucléotides. On n'observe jamais la présence de vitamines du groupe B ou de substances inhibitrices vis-à-vis des bactéries cellulolytiques aérobies.

SUMMARY

MICROBIOLOGICAL STUDY OF THE WHEAT RHIZOSPHERE.

III. — NATURE OF THE ROOTLETS EXCRETIONS AT THE END OF TILLERING.

The author determines the biochemical constitution of rootlets excretions of wheat var. *fylgia*, in aseptic cultures. Each plant contains 20 mg volatil fatty acids, 2 mg amino acids, a few thenth parts of mg oses and organic acids, and traces of nucleotids. Group B vitamins or inhibitory substances for aerobic cellulolytic bacteria are never found

BIBLIOGRAPHIE

- [1] RIVIÈRE (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **29**, 279.
- [2] RIVIÈRE (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 231.
- [3] FRIES (N.) et FORSMAN (B.). *Physiol. Plantarum*, 1951, **4**, 410.

- [4] DEHAY (C.) et CARRÉ (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 230.
- [5] NILSSON (P. E.) *Kgl. Lantbruks-Högskol. Ann.*, 1957, **23**, 175.
- [6] ROVIRA (A. D.) *Plant and Soil*, 1956, **7**, 179.
- [7] MESHKOV (N. V.). *Zhur. obsheher. Biol.*, 1952, **43**, 76.
- [8] BHUVANESWARI (K.) et SUBBA RAO (N. S.). *Proc. Indian. Acad. Sci.*, 1957, **45**, 299.
- [9] JAMES (A. T.) et MARTIN (P. J.). *Biochem. J.*, 1951, **50**, 679.
- [10] CHEFTEL (A. I.), MUNIER (R.) et MACHEBOEUF (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 380.
- [11] HIRST (E. L.) et JONES (J. K. R.). *Discuss. Faraday Soc.*, 1949, **7**, 268.
- [12] THOMPSON (J. F.), ZACCHARIUS (R. M.) et STEWART (F. C.). *Plant Physiol.*, 1951, **26**, 421.
- [13] HURLBERT (B. B.) et POTTER (V. R.). *J. biol. Chem.*, 1954, **209**, 23.
- [14] ADRIAN (J.). *Ann. Zootech.*, 1956, **4**, 295.
- [15] CARLES (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **241**, 1329.
- [16] CARLES (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 110.
- [17] CARLES (J.) et BOURGUET (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **411**, 383.

ÉTUDE SUR LA DIGESTION PANCRÉATIQUE DE LA CASÉINE POUR LA PRODUCTION DE LA TOXINE TÉTANIQUE

par M. AGHDACHI, A. SADEGH et H. MIRCHAMSY.

(Institut d'Etat Razi [Directeur : D^r A. RAYFI])

La préparation de la toxine tétanique pour la vaccination de l'homme se fait, dans la plupart des laboratoires du monde, au moyen du milieu décrit par Mueller et Miller [5 à 8]. La substance de base pour la fabrication de ce milieu est un hydrolysât enzymatique de caséine, que l'on trouve dans le commerce sous le nom de N. Z. case (Sheffield Farms Co. Inc). Nous avons cherché à remplacer ce produit par son équivalent préparé d'une manière simple.

Nous allons décrire la technique de la production du milieu et les résultats obtenus. L'étude des variations apportées à la formule originale de Mueller et le rôle des inhibiteurs dans ce milieu feront l'objet d'une autre note.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Extrait pancréatique.* — A 1 000 g de tissu pancréatique de bœuf bien dégraissé et haché on ajoute 3 litres d'eau distillée et 750 ml d'alcool éthylique à 96°. Le mélange est fortement agité et conservé à + 4° C jusqu'à l'utilisation. On peut conserver ce mélange plusieurs mois à basse température.

Digestion de la caséine. — On applique en principe la technique de Gladstone et Fildes [1]. Les irrégularités du résultat, les contami-

nations successives et d'autres difficultés nous ont incités à adopter la formule suivante :

Caséine (B.D.H.)	1 000 g
Carbonate de soude anhydre	60 g
Extrait pancréatique	500 ml
Eau distillée	10 l

On dissout le carbonate dans 5 litres d'eau distillée que l'on chauffe à 60° C. La caséine est lentement ajoutée à l'eau carbonatée chaude, afin de former une émulsion homogène. On y ajoute ensuite 5 litres d'eau distillée et l'extrait pancréatique. La température tombe ainsi à 30-40° C. Le mélange est distribué dans des flacons de 5 litres, à raison de 4 litres par flacon. On ajoute finalement 100 ml de chloroforme à chaque flacon. Le pH de départ étant 9,0 tombe après quelques heures de digestion à 7,4 et reste stationnaire. Les polypeptides et les acides aminés sont graduellement libérés dans le mélange pour arriver, vers le sixième jour, à un taux maximum qui ne varie que peu dans les jours suivants. Ces variations sont groupées dans le tableau I.

TABLEAU I. — Variations du pH, N total et N aminé, au cours de la digestion pancréatique de la caséine.

Temps	p H	N. aminé	N. T.
0 Heure	9,4	-	-
2 "	8,5	-	-
12 "	7,45	-	-
1 jour	7,45	3,8	11,7
2 "	7,4	4,25	12,3
3 "	7,4	4,7	12,4
4 "	7,4	4,9	12,7
5 "	7,4	5,09	12,75
6 "	7,4	5,18	12,6
7 "	7,4	5,15	12,65
8 "	7,4	5,2	12,7
9 "	7,4	5,2	12,6
10 "	7,4	5,25	12,6

A ce stade on sépare le liquide clair par siphonnage du précipité et du chloroforme renfermant les lipides, nuisibles à la toxinogénèse. Ce liquide sera porté à 90° C, puis refroidi à 30° C ; on ajuste le pH à 6,0 avec HCl concentré. On ajoute ensuite 20 g par litre de charbon animal (Darco 60). On agite le mélange qui reste ensuite trente minutes au repos. On le filtre d'abord sur des filtres Büchner, puis sur des plaques stérilisantes de Seitz. Cette digestion est prête à l'emploi.

Titration de l'azote total non protéique. — A 5 ml de l'hydrolysate on ajoute 5 ml d'une solution à 20 p. 100 d'acide trichloracétique. On centrifuge. On prélève 0,5 ml du liquide surnageant pour le titrage de l'azote par la méthode du micro-Kjeldahl.

Titration d'azote aminé. — L'azote titrable par le formol est mesuré par la méthode de Sørensen.

Préparation du milieu. — La formule utilisée est celle de Mueller et Miller (1954) de composition suivante :

Hydrolysate pancréatique de caséine	225	ml	
Macération de cœur de bœuf	50	ml	
Glucose	11	g	
NaCl	2,5	g	
Na ₂ HPO ₄ , 7 H ₂ O	1,5	g	
KH ₂ PO ₄	0,15	g	
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,15	g	
L-cystine	0,15	g	
L-tyrosine	0,5	g	
Pantothénate de Ca	0,001	g	
Uracile	0,0025	g	
Chlorhydrate de thiamine	0,00025	g	
Riboflavine	0,00025	g	
Pyridoxine	0,00025	g	
Biotine	0,000025	g	
Fer réduit	0,15	g	
Eau distillée jusqu'à	1 l		

On prépare des lots de 100 litres que l'on répartit dans des cylindres en pyrex de 22 × 45 cm (9 litres par cylindre) ou 22 × 25 cm (4 litres par cylindre). On stérilise les cylindres contenant le milieu et couverts par des couches de gaze et de coton à 115° C pendant soixante minutes.

TABLEAU II. — Comparaison entre les toxines tétaniques à base de digestion pancréatique préparée au Laboratoire (D. P.) et N. Z. case peptone (N. Z.).

Lot	Lf / ml.	KF / min.	D.M.M. / ml	Lf / mg. N. P.
			souris blanche	
D. P. 1	43,5	5	30 × 10 ⁶	860
D. P. 8	62,5	4	15 × 10 ⁶	700
D. P. 9	50	5	5 × 10 ⁶	450
D. P. 10	53	5	90 × 10 ⁶	550
D. P. 11	47,5	4	5 × 10 ⁶	540
N. Z. 52	50	8	30 × 10 ⁶	750
N. Z. 53	32,5	6	25 × 10 ⁶	850
N. Z. 54	37,5	7	10 × 10 ⁶	350

On refroidit les cylindres et on ensemence avec une culture de vingt-quatre heures en milieu au thioglycolate, de *Pl. tetani* souche Harvard. On retire les cultures incubées cinq jours à 33° C pour contrôler la stérilité, la toxicité sur souris, le pouvoir floculant et finalement la pureté, exprimée en nombres de Lf par mg d'azote protéinique.

Les résultats sont exposés dans le tableau II.

Préparation de l'anatoxine. — Afin d'extraire la toxine endocellulaire, les cultures sorties de l'étuve sont soumises à la congélation-décongélation [4].

On y ajoute enfin 0,4 p. 100 de formol à 40 p. 100 et l'on conserve trois semaines à 37° C. On éprouve ensuite l'innocuité des préparations sur souris (0,5 ml par voie sous-cutanée) et sur cobayes (2 ml par voie intramusculaire). On emploie pour chaque lot 6 cobayes et 12 souris. Quand les résultats sont satisfaisants, on siphonne le surnageant ; les corps bactériens désintégrés étant précipités au fond des flacons, on les élimine par filtration sur papier filtre.

Purification de l'anatoxine. — La purification de l'anatoxine par fractionnement au sulfate d'ammonium ainsi que son adsorption sur phosphate d'alumine naissant se font selon la formule de INH Boston (2,3).

TABLEAU III. — Pouvoir antigénique des diverses anatoxines tétaniques préparées sur milieu Mueller-Miller.

Antigène N°	Lf/Mg N.p	Epreuve Après 2 Semaines Avec 20 D.M.M.T.T.				
		Nombre de cobayes	Sans réaction après 4 semaines	Paralyse Locale	Mort de tetanos	Survie après 4 semaines
D.P.* 1	1470	10	10	0	0	100 %
D.P.* 2	1060	10	10	0	0	100 %
D.P.* 3	1150	10	10	0	0	100 %
D.P.* 4	1200	10	10	0	0	100 %
D.P.* 7	1100	10	10	0	0	100 %
D.P.* 10	1000	10	10	0	0	100 %
N.Z.case** 22	890	10	10	0	0	100 %
N.Z.case** 24	1135	10	10	0	0	100 %
N.Z.case** 34	690	10	10	0	0	100 %
N.Z.case** 35	750	10	10	0	0	100 %
N.Z.case** 37	1240	10	10	0	0	100 %
N.Z.case** 52	1000	10	10	0	0	100 %

* D. P. = digestion pancréatique de caséine.

** N. Z. case (Peptone commerciale) Sheffield Inc.

Antigénicité de l'anatoxine adsorbée. — On inocule 10 cobayes de 350 g avec 1 ml de produit contenant 5 Lf de l'antigène et 3 mg du phosphate d'alumine.

Après quatorze jours on éprouve ces cobayes avec 20 D. M. M. de toxine tétanique desséchée et remise en solution.

Les injections sont faites par voie sous-cutanée. Pour chaque lot on inocule deux cobayes avec 1 D. M. M. de la même toxine. Ces témoins doivent mourir dans un délai de cinq jours.

Le test est satisfaisant si 50 p. 100 au moins des cobayes résistent à l'épreuve sans montrer aucune réaction. Le tableau III illustre l'antigénicité d'un certain nombre de lots préparés avec notre digestion pancréatique et la peptone N. Z. case (tableau III).

RÉSUMÉ. — Pour la préparation de la digestion pancréatique de caséine une formule simple est décrite. Cette digestion peut remplacer les produits commerciaux semblables dans la fabrication à large échelle de la toxine tétanique.

SUMMARY

STUDIES ON THE PANCREATIC DIGESTION OF CASEIN, WITH A VIEW TO TETANUS TOXIN PRODUCTION.

A simple formula for pancreatic digestion of casein is described. The product obtained can be used as the nitrogenous source in large scale production of tetanus toxin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GLADSTONE (G. P.) et FIELDS (P.). *Brit. J. exp. Path.*, 1940, **21**, 161.
- [2] LEVINE (L.) et STONE (L. J.). *J. Immunol.*, 1951, **67**, 235.
- [3] LEVINE (L.), STONE (L. J.) et WYMAN (L. J.). *J. Immunol.*, 1955, **75**, 301.
- [4] MIRCHAMSY (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 402.
- [5] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Immunol.*, 1943, **47**, 15.
- [6] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Immunol.*, 1945, **50**, 377.
- [7] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Immunol.*, 1947, **56**, 143.
- [8] MUELLER (J. H.) et MILLER (P. A.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 271.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Etude quantitative de l'utilisation des sucres par *Pasteurella pestis* souche E. V. en suspensions non proliférantes. —
II. Le glucose. Autodestruction à 37° du pouvoir de dégrader le glucose pour les germes cultivés à 26°, par
A. DODIN et E. R. BRYGOO.

Recherches sur la sensibilité aux antibiotiques, à la furadoïne et aux sulfamides, de bactéries du groupe des *Klebsiella*, par A. LUTZ et A. SCHAEFFER.

Chimiothérapie anti-tuberculeuse chez le rat, par M^{me} F. GRUMBACH.

L'inactivation de l'isoniazide chez le rat. Son incidence sur les résultats du traitement de la tuberculose du rat par l'isoniazide, par M^{me} F. GRUMBACH, J. GROSSET et G. CANETTI.

Biochimie de l'inflammation. — I. Les hexosamines au niveau des réactions cutanées d'Arthus et de Shwartzman, par S. BAZIN et A. DELAUNAY.

Résistance du rat hypophysectomisé à une salmonellose expérimentale, par L. CHEDID et F. BOYER.

Sur le titrage des sérums anti-venimeux. — II. Le pouvoir toxique du venin de vipère (*Vipera aspis*) pour la souris inoculée par voie nasale ; sa neutralisation par les sérums anti-venimeux spécifiques, par F. ROGER, R. LAMY et M^{me} A. ROGER.

LIVRES REÇUS

G. Pincus. — *Hormones and atherosclerosis. Proceedings of the Conference held in Brighton, Utah, March, 11-14, 1958.* 1 vol., 484 p., Academic Press, New-York, 1959. Prix : \$ 13,50.

Cet ouvrage constitue la réunion des trente-deux communications présentées à la Conférence de Brighton en 1958.

La majeure partie des différents aspects des problèmes posés par l'athérosclérose et l'influence des hormones est ainsi passée en revue. On peut grouper les différents problèmes en quatre chapitres : Métabolisme du cholestérol ; Rôle des hormones dans le métabolisme des lipides ; Influence des différentes hormones sur l'athérosclérose expérimentale ; Relation entre la lipémie et les hormones chez l'homme et l'animal.

Les résultats expérimentaux prouvent que l'hormone thyroïdienne ACTH influence le taux de la lipémie chez l'homme, mais on ignore son action sur l'athérosclérose, ce qui pose le problème de l'utilité de l'hormone en thérapeutique.

La présentation très claire des différentes communications et des discussions facilitera au profane la lecture de cet ouvrage.

A. E.

V. Bryson. — *Microbiology yesterday and today.* 1 vol., 122 p., Institute of Microbiology, Rutgers University, New-Brunswick, N. J., édit., 1959. Prix : \$ 4,55.

Dans ce volume sont publiés les textes de conférences faites au Symposium qui s'est tenu en juin 1958 en l'honneur du soixante-dixième anniversaire de Waksman. Chacune d'elles est une vue d'ensemble sur certains grands sujets de la microbiologie. Leurs titres sont les suivants :

Quartel : Biochimie microbienne et ses progrès. Boyd Woodruff : Les antibiotiques. Un nouveau champ de recherche microbiologique. Perspectives d'avenir. Heidelberger : Episodes de l'immunochimie. Cowan : Classification bactérienne. Problèmes et progrès. Bryson : Quelques apports de la génétique à la microbiologie. Skriabin : Aspects de la microbiologie russe. Waksman : Microbiologie d'hier et d'aujourd'hui.
L. L.

Sulfur in proteins : Proceedings of a Symposium held at Falmouth Massachusetts, May 1958. 1 vol., 469 p., Academic Press, New York et Londres, 1959. Prix : \$ 14,00.

Cet ouvrage est le compte rendu d'un symposium qui a envisagé la plupart des problèmes concernant le soufre dans les protéines.

La première partie (10 articles) concerne l'étude des modifications chimiques et structurales que les groupes thiols et disulfures apportent dans les molécules protéiniques, l'introduction de nouveaux groupes thiols dans les protéines (et en particulier la thiolation de la gélatine) et les propriétés chimiques des groupes SH dans l'albumine du plasma de bœuf et leur rôle dans la coagulation sanguine. Les cinq articles suivants ont trait aux métalloprotéines et au rôle joué par le soufre dans le cytochrome C, l'hémoglobine et la ferritine.

D'autres auteurs abordent ensuite certains problèmes du soufre dans les enzymes, tel le rôle possible des groupements SH et disulfures dans la catalyse enzymatique à propos de quelques enzymes (aldolase, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, alcool-déshydrogénase, β -galactosidase).

Dans d'autres articles, ce sont les protéines du muscle qui sont étudiées, et en particulier le rôle des groupes SH dans la myosine et l'actine.

Enfin le symposium se termine par quelques articles moins classiques, tel celui sur les groupes SH masqués dans la protéine du virus de la mosaïque du tabac, ou celui sur le rôle des groupes thiols dans la structure et la fonction de l'appareil mitotique.

F. B.

V. D. Timakov. — *Microbial variation* (traduit du russe par G. H. Beale). 1 vol., 202 p., Pergamon Press, Londres, New York, Paris, Los Angeles, 1959. Prix : 40 s.

Ce livre est la traduction d'un ouvrage paru en U. R. S. S. Il comprend vingt-deux chapitres rédigés par différents auteurs et présentant diverses expériences montrant la transformation de bactéries et de virus sous l'influence de facteurs externes. La plupart de ces expériences sont faites avec des entérobactéries et leur protocole est analogue : une suspension chauffée de la bactérie transformante (*S. typhi murium* par exemple) est ajoutée à du liquide de Tyrode etensemencée par la bactérie que l'on veut transformer (*E. coli* par exemple) vivante. Après de nombreux passages suivis d'isolement, on trouve d'abord des colonies ayant perdu toute activité fermentaire (germe « alcalinisants »), qui acquièrent ensuite certains caractères de la bactérie transformante. Les auteurs

pensent qu'un mécanisme analogue se produit *in vivo* et que les bactéries alcalinisantes trouvées dans l'intestin pourraient se transformer en différentes espèces. Les auteurs espèrent, par cette méthode expérimentale, obtenir des bactéries ayant des propriétés immunisantes mais non pathogènes, permettant ainsi la vaccination par germes vivants. Les transformations se produisent aussi en remplaçant les bactéries transformantes chauffées par leur ADN. Les faits présentés par les auteurs semblent pleins d'intérêt. Mais on est un peu désorienté par des appellations et une méthodologie différentes de celles auxquelles nous sommes habitués. Ainsi tous les *E. coli* utilisés sont H_2S +. Quand ils sont transformés en *S. typhi murium*, ils deviennent H_2S —. Les analyses antigéniques des bactéries transformées seraient intéressantes à connaître. Or seuls les résultats globaux sont rapportés.

L. L.

Robert Koch. — *Briefe an Wilhem Kolle*. 1 vol., 67 p., G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1959. Prix : 18 DM.

Cette correspondance de Robert Koch permet de connaître certains événements de sa vie personnelle et d'imaginer ce que fut l'existence de ce bactériologiste qui était aussi un grand voyageur.

L. L.

A. Eyquem et L. Podliachouk. — *Le diagnostic biologique des rhumatismes inflammatoires chroniques et des collagénoses*. 1 vol., 120 p. Collection « Techniques de base ». Editions de la Tourelle, Saint-Mandé (Seine).

Les rhumatismes inflammatoires chroniques et les collagénoses ont fait l'objet d'un grand nombre d'études biologiques durant ces dernières années, et il n'est pas toujours aisé de faire le choix des réactions ou des techniques intéressantes, aussi bien pour la recherche que pour le diagnostic biologique. Ce fascicule n'a pas eu d'autre but que de faciliter l'accès dans ce domaine à des lecteurs qui n'ont pas pu se tenir au courant des évolutions récentes.

Après un bref rappel clinique et pathogénique, sont passés en revue les signes biologiques non spécifiques, puis les réactions spécifiques, de la polyarthrite chronique évolutive, en insistant notamment sur les données récentes concernant le facteur rhumatoïde.

Le même plan est adopté pour l'étude des collagénoses, et les signes biologiques non spécifiques sont comparés à ceux spécifiques du lupus érythémateux disséminé, responsables notamment des phénomènes de Hargraves et Hazerick, ou des substances antinucléaires.

A. E.

Houben Weyl. — *Methoden der organischen Chemie*. 4^e édit., entièrement remaniée, t. I, 2^e partie. *Allgemeine Laboratoriums Praxis II*. 1 vol. 1 017 p., 680 fig. Georg Thieme, édit., Stuttgart, 1959. Prix : DM 196. Prix de souscription : DM 176,40.

Ce volume est la suite du vol. I/1 des *Méthodes de Laboratoire* et débute par un chapitre très important sur les différentes opérations

de division de la matière. Leur connaissance est particulièrement intéressante pour effectuer des synthèses en milieu hétérogène.

Sont également décrits, dans un deuxième chapitre, les procédés de manipulation en l'absence d'oxygène et de l'humidité de l'air, sous pression élevée ou réduite.

Dans un troisième chapitre, le chimiste trouvera avec beaucoup d'intérêt une description des solvants les plus usuels, leur purification et leur déshydratation.

Enfin, dans un dernier chapitre, sont indiquées des règles de prudence pour éviter des accidents avec énumération des substances cancérogènes.

Les nombreux dessins et photographies facilitent la lecture, et la présentation est aussi excellente que celle des volumes précédents.

A. F.

Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut, dem Georg-Speyer-Haus und dem Ferdinand-Blum-Institut zu Frankfurt a/M., Heft 54. 1 vol., 150 p., 17 fig., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1957.

Ce numéro a été publié en l'honneur du Cinquantenaire de l'Institut Georg-Speyer. Il est consacré surtout à la chimiothérapie et contient des articles de Domagk sur la chimiothérapie de la tuberculose, de Heymann et Ihm sur la stérilisation du cerveau de souris syphilitique par le salvarsan, de Auhagen, Bonin et Ennekel, qui ont réalisé un tableau schématique de toutes les drogues chimiothérapeutiques et de leurs effets depuis la découverte de la première d'entre elles : la quinine. L'ouvrage comprend, en outre, une liste de tous les travaux scientifiques réalisés à l'Institut Georg-Speyer depuis sa fondation.

H. T.

Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut, dem Georg-Speyer-Haus und dem Ferdinand-Blum-Institut zu Frankfurt a/M., Heft 55. 1 vol., 129 p., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1958.

Ce fascicule décrit les activités diverses des trois Instituts de Frankfurt-am-Main, du 1^{er} janvier 1952 au 31 décembre 1956. Ces Instituts sont divisés en onze branches, qui comprennent la bactériologie, la sérologie, l'immunologie, la chimie, la chimiothérapie, la pharmacologie, etc. On donne également les titres de tous les travaux qui ont été réalisés au cours de ces cinq années.

The Chest & Heart Association
Library

H. T.

2nd Floor, MIA House,
Flaxman Terrace, W.C.1.

Printed in France.

Le Gérant : G. MASSON.